

Université de Montréal

**Évaluation de la capacité de l'estradiol à inhiber
l'activation pro-inflammatoire des cellules endothéliales
vasculaires induite par la protéine C-réactive**

par

Émilie Cossette

Département des sciences biomédicales, Institut de Cardiologie de Montréal

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de Maître *es* Science (M.Sc.)

en Sciences Biomédicales

option générale

Décembre 2011

© Émilie Cossette, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Évaluation de la capacité de l'estradiol à inhiber l'activation pro-inflammatoire des cellules
endothéliales vasculaires induite par la protéine C-réactive

Présenté par :
Émilie Cossette

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-Philippe Gratton, président-rapporteur
Dr. Jean-François Tanguay, directeur de recherche
Dr. Guillaume Lettre, membre du jury

Résumé

De nombreuses études ont contribué à dévoiler les mécanismes à la base de l'athérosclérose. Cette maladie est médiée par un important déséquilibre homéostatique, qui entraîne une inflammation vasculaire contribuant à sa progression. Plusieurs équipes de recherche ont axé leurs investigations sur l'étude d'importants biomarqueurs inflammatoires telle que la protéine C-réactive (CRP). Considérée comme facteur de risque de maladies cardiovasculaires, cette dernière participe aussi aux différents stades du développement de l'athérosclérose. Notre étude révèle pour la toute première fois un processus d'auto-induction de l'expression de la CRP régit par les CE vasculaires. Ce mécanisme représente une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour la prévention de l'athérosclérose.

L'estrogène (E2) est une hormone féminine qui possède un rôle athéroprotecteur via entre autres, la modulation de la réponse inflammatoire. Ainsi, nous avons cherché à déterminer si elle avait un effet bénéfique sur le profil athérogénique de la CRP exprimée par les cellules endothéliales (CE). En effet, nos travaux ont démontré que l'E2 a la capacité de moduler le rétrocontrôle positif de l'expression de la CRP, contribuant à diminuer également le profil inflammatoire de cette dernière. De plus, nous avons établi que l'E2 restitue une importante voie pro-angiogénique impliquant la réponse migratoire des CE au VEGF, en contrant l'effet d'inhibition de la CRP. Cette nouvelle découverte nous a permis d'éclaircir un important mécanisme de guérison vasculaire de cette hormone dans un contexte inflammatoire. Ainsi, ces données contribuent à mieux comprendre la production endogène de la CRP par les CE vasculaires et l'activité cardioprotectrice de l'E2.

Mots-clés : Protéine C-réactive, estrogène, athérosclérose, inflammation, cellules endothéliales

Abstract

Numerous studies have contributed to reveal the mechanisms underlying cardiovascular diseases such as atherosclerosis. This disease is mediated by an important homeostatic imbalance, which causes vascular inflammation contributing to its progression. Several research groups have focused their studies on inflammatory biomarkers such as C-reactive protein (CRP). Considered as a risk factor for cardiovascular diseases, it also participates in various stages of atherosclerosis development. Our study shows for the first time a process of self-induction of the CRP expression regulated by vascular EC. This mechanism represents a new potential therapeutic target for the prevention of atherosclerosis formation.

Estrogen (E2) is a female hormone which has an atheroprotective role through various vascular regulation mechanisms including modulation of the inflammatory response. Thus, we sought to determine whether it had a beneficial effect on atherogenic profile of CRP expressed by endothelial cells (EC). Indeed, our work has demonstrated for the first time that E2 has the ability to modulate the CRP expression positive feedback identified in our study, which also helps to reduce the inflammatory profile of the latter. In addition, we determined that E2 restores an important proangiogenic response involving migration of vascular EC to VEGF, by countering the inhibition effect of CRP. This new discovery has enabled us to clarify an important vascular healing mechanism of this hormone in an inflammatory context. Thus, these data provide further advances that contribute to a better understanding of the endogenous CRP production by vascular EC and the cardioprotective activity of E2.

Keywords : C-reactive protein, estrogen, atherosclerosis, inflammation, endothelial cells

Table des matières

<i>Résumé.....</i>	<i>i</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>ii</i>
<i>Table des matières.....</i>	<i>iii</i>
<i>Liste des abréviations.....</i>	<i>vii</i>
<i>Liste des figures.....</i>	<i>x</i>
<i>Remerciements.....</i>	<i>xiv</i>
1. Introduction.....	1
1.1 L'Athérosclérose	2
1.1.1 Description de l'endothélium vasculaire.....	2
1.1.1.1 Anatomie d'un vaisseau	2
1.1.1.2 Fonctions principales de l'endothélium	4
1.1.2 Définition de la maladie d'athérosclérose.....	6
1.1.3 Étapes de formation de la plaque d'athérosclérose	6
1.1.3.1 Initiation du processus athérosclérotique : Dysfonction et activation endothéliale	6
1.1.3.2 Formation et progression de la plaque : Évolution du cap fibreux	8
1.1.3.3 Rupture de la plaque : Affaiblissement du cap fibreux et thrombose	9
1.1.4 Facteurs de risque reliés à l'athérosclérose.....	10
1.1.4.1 Âge et sexe	11
1.1.4.2 Tabagisme	12
1.1.4.3 Hypertension	12
1.1.4.4 Diabète	13
1.1.4.5 Obésité et sédentarité	13
1.1.4.6 Hypercholestérolémie	14
1.1.4.7 Biomarqueurs de l'inflammation – protéine C-réactive.....	14
1.2 La protéine C-réactive (CRP)	16

1.2.1	Biomarqueur de l'inflammation et facteur de risque de maladies cardiovasculaires.....	16
1.2.2	Propriétés de la protéine.....	17
1.2.2.1	Structure et isoformes	17
1.2.2.2	Régulation de l'expression de la CRP.....	20
1.2.2.3	Fonction biologique au niveau du système immunitaire	21
1.2.2.4	Récepteurs et voies d'activation	23
1.2.3	Effets potentiels proathérogéniques et athérothrombotiques de la CRP sur les cellules vasculaires.....	24
1.3	L'estrogène : protection vasculaire	31
1.3.1	Biosynthèse et actions physiologiques des estrogènes	31
1.3.2	Les récepteurs estrogéniques.....	33
1.3.2.1	Structure	33
1.3.2.2	Localisation cellulaire	35
1.3.2.3	Activation et signalisation cellulaire.....	36
1.3.2.3.1	Voie génomique classique dépendante du ligand	36
1.3.2.3.2	Voie alternative indépendante du ligand.....	37
1.3.2.3.3	Voie non génomique dépendante du ligand	37
1.3.2	Les mécanismes de protection vasculaire de l'estrogène.....	38
1.3.2.1	Le profil lipidique	39
1.3.2.2	Les cellules vasculaires et la réendothélialisation.....	39
1.3.2.3	La régulation du monoxyde d'azote (NO)	41
1.3.2.4	Le processus inflammatoire	42
1.4	Problématique et but du projet de recherche.....	44
2.	<i>Article scientifique</i>	46
2.1.1	Estradiol inhibits vascular endothelial cells pro-inflammatory activation induced by C-reactive protein.....	47
2.1.1.1	Abstract	48
2.1.1.2	Introduction.....	49

2.1.1.3 Material and methods	52
2.1.1.3.1 Reagents	52
2.1.1.3.2 Cells culture	52
2.1.1.3.3 Analysis of protein expression by Western blot	53
2.1.1.3.4 ELISA assay for IL-6, IL-8 and VEGF	54
2.1.1.3.5 Migration assay of HAEC	54
2.1.1.3.6 VEGFR-2 expression on HAEC by flow cytometer	55
2.1.1.3.7 Statistical analysis	55
2.1.1.4 Results	56
2.1.1.4.1 Auto-induction of CRP production by HAECs	56
2.1.1.4.2 E2 inhibits auto-induction of CRP by HAECs	56
2.1.1.4.3 E2 reduces CRP-induced pro-inflammatory cytokine response	56
2.1.1.4.4 E2 reduces CRP-induced adhesion molecule upregulation	57
2.1.1.4.5 E2 restores HAECs migration reduced by CRP	57
2.1.1.4.6 VEGF and VEGFR-2 in E2 mediated migration of CRP-treated EC ...	58
2.1.1.5 Discussion	60
2.1.1.7 References	67
2.1.1.8 Figure Legends	71
2.1.1.9 Figures	73
3. Discussion	79
3.1 Formation de la CRP monomérique lors de la purification de la protéine	82
3.1.1 Implications des contaminants dans la solution commerciale de la CRP	82
3.1.2 La purification de la CRP entraine un changement de conformation	83
3.1.3 Solutions choisies et changements apportés à la méthode de purification	86
3.2 Auto-induction de l'expression de la CRP par les CE vasculaires	88
3.2.1 Expression de la CRP par les HAEC	88
3.2.2 Diminution de l'auto-induction de la CRP par l'E2	91
3.3 Implication des récepteurs CD32 et CD64 dans l'activité biologique de la CRP	95

3.4 Modulation par l'E2 de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induite par la CRP	97
3.4.1 Hausse de production d'IL-6 et d'IL-8 induite par la CRP.....	97
3.4.2 Impact de l'E2 sur la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 induite par la CRP	100
3.5 Impact de l'E2 sur la capacité de la CRP à induire la migration et l'adhésion des monocytes.....	102
3.5.1 Essai de migration des monocytes en Transwell.....	102
3.5.2 Expression d'ICAM-1/VCAM-1 et adhésion des monocytes sur une monocouche de CE.....	104
3.6 L'E2 rétablit la migration des CE au VEGF altérée par la CRP	107
3.6.1 Inhibition de la migration des CE par la CRP.....	107
3.6.2 Rétablissement de la capacité migratoire des cellules traitées à la CRP par l'E2	108
3.6.3 Implication du NO dans l'effet de l'E2.....	109
3.6.4 Implication des espèces réactives à l'oxygène (ROS)	111
3.6.5 Modulation de la sécrétion de VEGF et de l'expression du VEGFR-2	113
4. Conclusion.....	115
5. Bibliographie.....	118

Liste des abréviations

AF	<i>Activation function</i>
AHA	<i>American Heart Association</i>
ANG II	Angiotensine II
ApoB	Apolipoprotéine B
ApoE ^{-/-}	<i>Apolipoprotein E-Knockout</i>
AT1-R	Récepteur de l'angiotensine de type I
AVC	Accident vasculaire cérébral
BAEC	<i>Bovine aortic endothelial cell</i>
C4BP	<i>C4-binding protein</i>
CCR2	<i>CC-chemokine receptor-2</i>
CDC	Centre de prévention et de contrôle des maladies
CE	Cellule endothéliale
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
CEP	Cellule endothéliale progénitrice
CMLV	Cellules musculaires lisses vasculaires
CRP	Protéine C-réactive
CRPtg	Souris transgénique transportant le gène de la CRP
DBD	<i>DNA binding domain</i> , domaine de liaison à l'ADN
E2	Estrogène, Estradiol, 17 β estradiol
E. Coli	<i>Escherichia coli</i>
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
EPCR	Récepteur de la protéine C endothéliale
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ET-1	Endothéline -1
FAS	<i>Fatty acide synthase</i>
Fc γ R	<i>Fc gamma receptor</i>
FRS	<i>Framingham Risk Score</i>
HAEC	CE aortique humaine
HDL	Lipoprotéine de haute densité

hsCRP	CRP hautement sensible
HSP	<i>Heat shock protein</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vascular endothelial cell</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IL	Interleukine
INF- γ	Interféron γ
JAK	<i>Janus-activated kinase</i>
JNK	<i>C-Jun N-terminal kinase</i>
LBD	<i>Ligand-binding domain</i> , domaine de liaison au ligand
LDL	Lipoprotéine de basse densité
LOX-1	<i>Lectin-like oxidized LDL receptor-1</i>
Lp(a)	Lipoprotéine (a)
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
mCRP	CRP monomérique
mCRP _m	mCRP membranaire
MCV	Maladie cardiovasculaire
M-CSF	Facteur de stimulation de colonie de macrophages
MMP	Métalloprotéinase
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaN ₃	Sodium azide
NF- κ B	<i>Nuclear factor- κB</i>
NO	Monoxyde d'azote
O ²⁻	Superoxyde
oxLDL	LDL oxydé
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PCh	Phosphatidylcholine
pCRP	CRP pentamérique
RE	Récepteur estrogénique

rhCRP	CRP recombinante humaine
ROS	Espèce réactive à l'oxygène
SAA	Sérum amyloïde A
SAP	Sérum amyloïde P
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription factor 3</i>
TF	Facteur tissulaire
TFPI	Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
t-PA	Activateur plasminogène de tissu
TRH	Thérapie de remplacement hormonale
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité
WPB	<i>Weibel-Palade bodies</i>

Liste des figures

- Figure 1. Artère de calibre moyen et ses trois tuniques : intima, média et adventice.** Le vaisseau sanguin est une structure complexe en forme de conduit. La tunique la plus interne, l'intima, est en contact direct avec la lumière où circule le sang. La média est la tunique centrale et est entourée de part et d'autre des limitantes élastiques interne et externe. La tunique externe est dite adventice. Chez les vaisseaux de taille plus importante, un réseau de micro-vaisseaux, le vasa vasorum, parcourt l'adventice, la média ainsi que la couche sous-endothéliale. Image adaptée de [1]..... 2
- Figure 2. Étapes du développement d'une lésion athérosclérotique.** Le processus athérosclérotique débute par la dysfonction endothéliale où une baisse importante de production de NO et l'infiltration de LDL est observés (étape 1). Durant les étapes 2 et 3, les leucocytes sont recrutés dans l'intima par les CE activées et se transforment en cellules spumeuses suite à l'ingestion de oxLDL. Les CMLV provenant de la média forment le cap fibreux et induisent la production de matrices extracellulaires (ex. : collagène) qui renforcent la formation de la plaque et du cap fibreux (étapes 4 et 5). La rupture de la plaque expose des agents thrombotiques tel le TF qui entraîne la production de fibrine et l'attachement de plaquettes pour mener à la formation d'un thrombus (étapes 6 et 7). Image modifiée de [14] 10
- Figure 3. Structure pentamérique de la CRP.** Structure 3D cristallographique en rayons X de la molécule de CRP avec les deux ions calcium liés à chacun des protomères. Image tirée de [45] 18
- Figure 4. Effets pro-athérogéniques de la CRP dans les différents stades de l'athérosclérose.** La CRP provoque une dysfonction (A) et une activation endothéliale (B) menant à la formation de la plaque d'athérome (C) et à sa rupture (D). La CRP inhibe le recrutement des CEP de la moelle osseuse au site de lésion en diminuant leur survie et leurs fonctions (E). Image traduite de [101]..... 28
- Figure 5. Formation des hormones sexuelles stéroïdiennes.** Le cholestérol, à l'origine des différentes hormones stéroïdiennes, subit une suite de réactions enzymatiques pour

former les précurseurs des hormones féminines, l'androstènedione et la testostérone. Par l'activité d'une aromatasé, ces précurseurs sont convertis en estradiol, en estrone et en estriol. Image tirée de [111]...... 32

Figure 6. Représentation schématique de la structure commune des domaines fonctionnels des récepteurs estrogéniques RE- α et RE- β humains. La structure des RE est composée de trois différents domaines, soit le domaine NH₂-terminal ou A/B, le domaine de liaison à l'ADN ou C et le domaine de liaison du ligand ou D/E/F. Les régions responsables de l'activation transcriptionnelle AF-1 et AF-2, de la translocation nucléaire, de la dimérisation, de la liaison à l'ADN et de la liaison aux co-activateurs et co-répresseurs sont indiquées d'un trait. Les pourcentages représentent le rapport d'homologie entre les deux récepteurs. Image traduite et modifiée de [119]...... 34

Figure 7. Mécanismes d'activation et de signalisation de l'E2 dans les cellules vasculaires. Les RE peuvent engendrer une réponse cellulaire par différentes voies de signalisation, soit la voie classique dite génomique, la voie non-génomique et la voie alternative indépendante du ligand. Cette dernière peut initier l'activation de la voie génomique par la phosphorylation des RE. Image traduite de [132] ER - estrogen receptor; ERE - *estrogen element response*; GFR - *growth factor receptor*; TF - *transcription factor*; CoA - co-activateur; CoR - co-répresseur. 38

Figure 8. Évaluation de l'isomérisation de la CRP détoxifiée. Les isoformes de CRP présentes dans la solution détoxifiée sont évaluées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant 1/20^{ème} de SDS. Les protéines sont visualisées par coloration au bleu de Coomassie. La CRP native est utilisée comme contrôle pour la forme pentamérique et celui de la forme monomérique est produit selon la technique de Taylor et al, c'est-à-dire à partir de CRP native chauffée à 70°C pendant 1 h. [181] Pour chaque échantillon, 10 ug de protéines sont ajoutés aux puits. 86

Figure 9. Évaluation de l'auto-induction de la CRP suite à un pré-traitement à l'E2 de 24 h. L'expression protéique de la CRP est évaluée chez les HAEC suite à un pré-traitement à l'E2 de 24 h (10⁻⁸ et 10⁻⁹M) et d'une stimulation à la rhCRP de 24 h (25

ug/ml) les deux seul ou combinés. Le taux de production de CRP est déterminé par immunobuvardage de type western et normalisé sur le taux protéique de l'actine β . N=2..... 94

Figure 10. Évaluation de la sécrétion d'IL-8 relâchée par les HAEC suite à l'ajout d'inhibiteurs. Production d'IL-8 par les cellules suite à un traitement avec l'apocynine, le TEMPOL, le SB203580 et l'U0126 de 1 h suivi d'une stimulation à la rhCRP (25 ug/ml) de 24 h. La méthode d'ELISA est utilisée afin de mesurer le taux d'IL-8 dans les surnageants. Les résultats sont reportés en % d'IL-8 sécrétée pour chaque condition en rapport avec la condition non stimulée (NS) N=4. ** $p < 0,001$ vs Non stimulés; § $p < 0,001$ vs CRP. 99

Figure 11. Migration des monocytes en fonction d'une stimulation dose-réponse de la CRP. Pour mesurer la migration des monocytes en fonction des chimioattractants relâchés par les CE, les HAEC sont tout d'abord stimulées 24 h avec des doses croissantes de rhCRP (1; 2,5; 5; 10 and 25 ug/ml) et par le LPS (1 ug/ml) utilisé comme contrôle positif de stimulation. Le surnageant est récolté et ajouté dans les puits du bas d'une plaque de 96 puits d'un système Transwell. La MCP-1 (50 ng/ml) est utilisée comme contrôle positif de migration. Les cellules THP-1 sont ajoutées dans les puits du haut de la plaque et leur capacité migratoire est évaluée suite à un temps d'incubation de 1 h 30 à 37°C en présence de 5 % de CO₂. Les cellules sont fixées au méthanol et colorées à l'hématoxyline-éosine. Trois champs uniformément espacés sur chaque membrane ont été choisis et les cellules migrées sont comptées. Le graphique est exprimé en nombre de monocytes migrés. N=2. 104

*« La vérité scientifique sera toujours plus
belle que les créations de notre imagination
et que les illusions de notre ignorance. »*

[Claude Bernard]

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier le Dr Jean-François Tanguay d'avoir cru en mon potentiel et de m'avoir acceptée au sein de sa formidable équipe de recherche en tant qu'étudiante à la maîtrise. Ces trois années de formation m'ont permis d'acquérir des compétences qui me seront indispensables dans ma recherche d'emploi ainsi que dans ma future carrière, mais également de développer des qualités qui m'ont aidé à grandir sur le plan personnel. Je suis très heureuse d'avoir eu la chance de faire partie de votre extraordinaire équipe de laboratoire et d'avoir pu participer à l'avancement de vos projets de recherche innovateurs et très prometteurs.

Merci au Dr Jean-Philippe Gratton et au Dr Guillaume Lettre de prendre de votre temps pour l'évaluation de ce mémoire.

Merci au Dre Isabelle Cloutier pour son soutien tout au long de mes travaux, ses nombreux conseils et pour le temps qu'elle m'a accordé afin de s'assurer de la réussite de mon projet de recherche. Merci également pour son aide précieuse qui m'a permis de compléter ce mémoire de maîtrise ainsi que la rédaction de mon article scientifique.

Un merci particulier pour Kim Tardif, qui m'a offert son support dès mon entrée au laboratoire en tant que stagiaire et qui a été pour moi, un véritable modèle à suivre! Tu as joué le rôle de mentor, mais tu as également représenté une source d'inspiration et de motivation au cours de ces dernières années. Merci de m'avoir épaulée dans chaque moment difficile traversé durant ma maîtrise, de m'avoir toujours soutenue et d'avoir cru en mes capacités. Sans toi, je n'aurai jamais pu traverser cette belle aventure aussi fièrement!

Merci à Pascale Geoffroy, Julie Lebel, Sandra Gilligan et Marie-Ève Clavet pour leur jovialité et leur dynamisme, créant une équipe de recherche des plus extraordinaires!

Merci d'avoir accordé de votre temps à plusieurs reprises pour m'aider dans l'avancement de mes travaux, mais également pour votre support moral et votre gentillesse. C'est avec des collègues comme vous qu'on développe une authentique passion pour notre travail!

Je voudrais également remercier Corinne St-Denis qui m'a aidé tout au long de mon parcours par ses conseils et ses encouragements et qui s'est révélée être au-delà d'une simple collègue, une véritable amie.

Merci également à Geneviève Donpierre, une fabuleuse stagiaire qui est devenue une collègue très appréciée ainsi qu'à Geneviève Morin pour son professionnalisme qui n'a d'égale que son humour. Merci pour ces nombreuses occasions de fous rires au moment où l'on en a eu le plus besoin!

Enfin, j'aimerais remercier tout spécialement mon conjoint Sébastien, pour son amour et son support inconditionnel, ma mère Suzie, qui a toujours cru en moi depuis l'enfance et qui m'a accordé une aide indispensable tout au long de mes études ainsi que ma meilleure amie Camille, qui m'a permis de garder le sourire et de ne pas oublier de m'amuser! Sans vous, je n'aurai pu accomplir toutes ces années d'études. Merci!

1. Introduction

1.1 L'Athérosclérose

1.1.1 Description de l'endothélium vasculaire

1.1.1.1 Anatomie d'un vaisseau

Il existe trois principaux types de vaisseaux sanguins soit les artères, les capillaires et les veines. Au niveau anatomique, les vaisseaux sont des conduits qui transportent le sang du cœur aux poumons et aux différents organes du corps humain. Ils permettent donc de fournir de l'oxygène et des nutriments aux diverses cellules de l'organisme.

Une artère normale est constituée principalement de trois régions morphologiques distinctes appelées couches ou tuniques, soit l'intima, la média et l'adventice (figure 1).

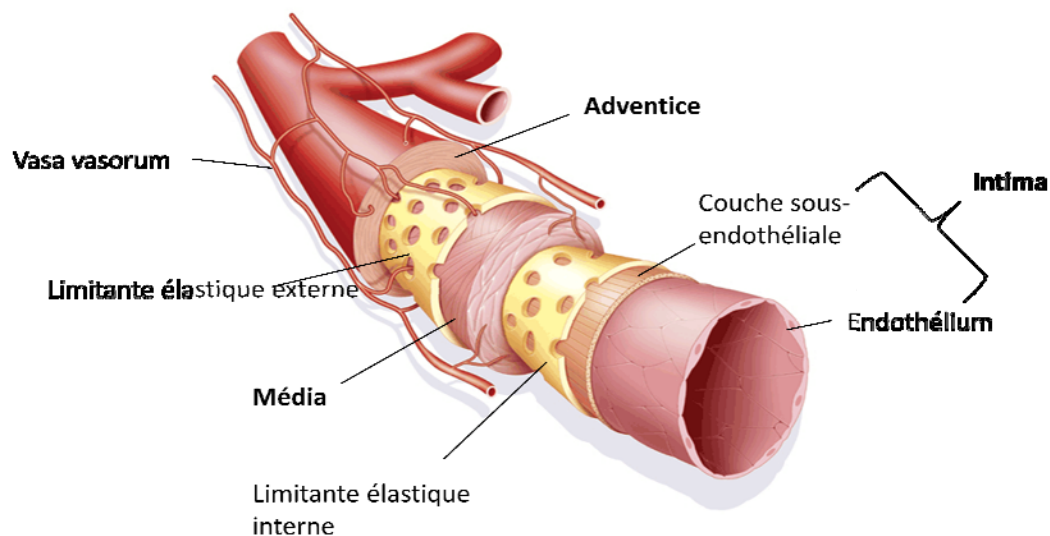


Figure 1. Artère de calibre moyen et ses trois tuniques : intima, média et adventice. Le vaisseau sanguin est une structure complexe en forme de conduit. La tunique la plus interne, l'intima, est en contact direct avec la lumière où circule le sang. La média est la tunique centrale et est entourée de part et d'autre des limitantes élastiques interne et externe. La tunique externe est dite adventice. Chez les vaisseaux de taille plus importante, un réseau de micro-vaisseaux, le vasa vasorum, parcourt l'adventice, la média ainsi que la couche sous-endothéliale. Image adaptée de [1]

L'intima ou tunique interne est composée d'une seule couche de cellules endothéliales (CE) situées du côté de la lumière artérielle permettant un contact direct avec les cellules sanguines circulantes. Cet endothélium simple squameux est constitué de cellules plates et polarisées qui s'imbriquent les unes dans les autres pour former une surface lisse minimisant la friction entre le sang et la face interne du vaisseau. La face apicale de la cellule est en contact avec la lumière du vaisseau tandis que la face basale recouvre quant à elle une lame basale composée de collagène synthétisé par l'endothélium. Dans les artères plus importantes dont le diamètre est de plus de 1 mm, l'endothélium repose sur une couche sous-endothéliale faite de tissu conjonctif lâche.[2]

La média ou tunique moyenne est la couche la plus épaisse des artères. Elle est constituée de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et de matrices extracellulaires telles que le collagène et les fibres élastiques (monomères de tropoélastine, microfibrilles et protéoglycanes). Dans les vaisseaux de fort calibre, la média est bordée de part et d'autre par une lame élastique appelée limitante élastique interne ou externe. Cette dernière permet d'augmenter l'élasticité de la paroi afin de régulariser les changements de pression artérielle. La tunique moyenne joue donc un rôle prépondérant dans la régulation de la circulation sanguine. [3]

La tunique externe de l'artère, l'adventice, est constituée principalement de fibroblastes et de myofibroblastes situés à l'intérieur de faisceaux de collagène et entourés de protéoglycanes. [4] Les fibres de collagène lâchement entrelacées protègent et renforcent les vaisseaux en les stabilisent aux structures environnantes. L'adventice est parcourue de neurofibres, de vaisseaux lymphatiques et également d'un réseau de petits vaisseaux sanguins nommés vasa vasorum nourrissant le tissu externe ainsi que la media de vaisseaux plus importants. La structure des vasa vasorum varie selon la grosseur, la fonction et la localisation des vaisseaux. [3]

Ces trois couches forment également les parois des veines et veinules ainsi que de tous les types d'artères soient les artères élastiques, les artères musculaires et les artérioles. Les capillaires quant à eux, sont composés uniquement d'endothélium et d'une lame basale

en contact étroit avec les cellules sanguines. Les capillaires permettent les échanges entre le sang et le liquide interstitiel en contact avec les cellules, leur fournissant les nutriments nécessaires à leur bon fonctionnement physiologique. [2]

1.1.1.2 Fonctions principales de l'endothélium

D'un point de vue anatomique, l'endothélium a comme principale fonction de contenir le sang à l'intérieur des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Au-delà de ce rôle, un endothélium normal est un gardien primordial de l'intégrité artérielle. En effet, celui-ci participe à la régulation du débit sanguin par des mécanismes de vasodilatation et de vasoconstriction, mais confère également des propriétés anti-inflammatoires et anti-thrombotiques aux surfaces vasculaires.

Les CE sont reliées par des jonctions serrées et forment un endothélium continu. Elles composent une barrière qui empêche les protéines plasmatiques et les cellules circulantes du sang de passer. Par contre, cette barrière n'est pas statique. En 1966, des études en microscopie électronique révèlent la présence de granules de stockage spécifiques des CE, soit des vésicules de plasmalemme et des corps de Weibel-palade (WPB) qui libèrent leur contenu sous l'effet de différents agonistes. De plus, la présence de fenestration dans l'endothélium est observée pour la première fois démontrant la perméabilité des CE. [5] Cette monocouche cellulaire constitue donc une barrière sélective entre le flux sanguin et la paroi de l'artère. En effet, l'endothélium est semi-perméable et permet le transport régulé de fluides et molécules, contrôlant les échanges entre le sang et le tissu. En conditions basales, l'endothélium permet un flux d'échange continu. En général, les fluides et petits solutés diffusent de façon passive à travers la barrière endothéliale. Par contre, les macromolécules utilisent des voies transcellulaires telles que les cavéoles membranaires qui permettent leur passage à travers la cellule. Ces dernières occupent jusqu'à 50 % de la membrane plasmatique luminale. Ces cavéoles forment des agrégations régionales de radeaux lipidiques et contiennent divers récepteurs et systèmes de signalisation. [6] Ces échanges peuvent être modulés par l'hétérogénéité structurelle et fonctionnelle de la perméabilité endothéliale, mais peuvent également devenir inductible

lors d'inflammation chronique ou aiguë. L'endothélium devient alors perméable à certains types cellulaires tels les leucocytes présents dans la circulation et permet leur migration transendothéliale. [5]

L'importance de l'endothélium dans le contrôle du tonus vasculaire et le maintien de l'homéostasie vasculaire est reconnue pour la première fois en 1980. À cette époque, Furchgott et Zawadzski démontrent la production par les CE d'un agent relaxant, le monoxyde d'azote (NO), qui induit la vasodilatation des vaisseaux. [7] Depuis, la production de plusieurs autres molécules vasoactives a été démontrée telles la bradykinine, la prostacycline, l'angiotensine II (ANG II) et l'endothéline-1 (ET-1) qui relaxent ou contractent les CMLV des vaisseaux. [7] L'équilibre entre ces différents facteurs permet le maintien des fonctions hémodynamiques vasculaires telles que l'apport en oxygène aux tissus, la demande métabolique ainsi que le remodelage structurel en régulant le tonus des vaisseaux et leur diamètre. [7]

L'endothélium possède également des propriétés anticoagulantes, anti-agrégantes et anti-inflammatoires. La fluidité du sang est activement maintenue par plusieurs mécanismes dépendants des CE. En effet, les CE expriment plusieurs molécules anticoagulantes et anti-agrégantes telles que l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), l'héparine, la thrombomoduline, le récepteur de la protéine C endothéliale (EPCR), l'activateur plasminogène de tissu (t-PA), la prostacycline et le NO qui limitent la formation de thrombus lors d'une brèche de l'intégrité de la paroi vasculaire. [5] Les CE contrôlent aussi l'activité inflammatoire en séquestrant dans les corps de Weibel-Palade certaines molécules importantes pour l'adhésion et la transmigration des leucocytes telles la P-sélectine et certaines chimiokines, les relâchant seulement en réponse à diverses stimulations. De plus, dans leur état basal, les CE suppriment également la transcription de molécules d'adhésion comme E-sélectine, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) et ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*). La production constitutive de NO contribue aussi à la pacification de l'endothélium par différents mécanismes incluant l'inhibition de

l'expression de gènes pro-inflammatoires, de la fusion des vésicules WPB avec la surface des CE et de l'activation leucocytaire. [6]

1.1.2 Définition de la maladie d'athérosclérose

L'athérosclérose est responsable d'une obstruction progressive du système artériel pouvant se manifester par une maladie coronarienne aigüe ou chronique. Elle est caractérisée par la formation d'une plaque d'athérome composée de lipides extracellulaires plus particulièrement de cholestérol, de cellules nécrotiques et de CMLV provenant de la paroi des artères. Le développement de ces plaques dans les artères provoque une diminution de l'élasticité des parois ainsi qu'une réduction de la lumière pouvant mener éventuellement à des complications cardiovasculaires sévères telles que l'angine stable ou instable, la thrombose et l'infarctus du myocarde. Cette maladie peut être initiée suite à une lésion anatomique et fonctionnelle de l'intégrité de l'endothélium menant à une inflammation vasculaire. [8] En effet, l'athérosclérose n'est pas seulement une maladie dégénérative due au vieillissement mais plutôt une condition inflammatoire chronique. Celle-ci résulte de l'altération du métabolisme du cholestérol et des autres facteurs de risques de maladies coronariennes tels que la dyslipidémie, le diabète, le tabagisme, l'hypertension artérielle et l'obésité qui entraînent une dysfonction de la paroi des artères. [9]

1.1.3 Étapes de formation de la plaque d'athérosclérose

1.1.3.1 Initiation du processus athérosclérotique : Dysfonction et activation endothéliale

L'initiation de la maladie résulte de changements dynamiques des vaisseaux vasculaires. Les CE favorisent la défense de l'hôte menant au détriment de l'activité cellulaire et à l'inflammation de la couche endothéliale. Ce phénomène entraîne une diminution de la production et de la disponibilité de NO et de la prostacycline, principaux médiateurs de la dilatation des vaisseaux, ainsi qu'à une augmentation de sécrétion de

vasoconstricteurs tels l'ET-1 et l'ANG II [10]. Ce déséquilibre de l'homéostasie des CE catalyse une augmentation des forces hémodynamiques (pression sanguine) sur l'endothélium et des forces de cisaillement modulant la perméabilité de la barrière endothéliale. Ceci permet à certaines molécules telles le cholestérol et les lipoprotéines(a) (Lp(a)) de diffuser passivement à travers les jonctions cellulaires et d'entrer dans la paroi vasculaire.[9]

L'augmentation du niveau de cholestérol dans le sérum est une des principales causes pouvant mener à la formation de l'athérosclérose et ce, même en absence des autres facteurs de risques. La majorité du cholestérol est transporté par les lipoprotéines de basse densité (LDL). Contrairement aux lipoprotéines de très basse densité (VLDL) dont la principale fonction est de transporter les acides aminés vers le tissu adipeux et les muscles, les LDL délivrent le cholestérol dans les tissus périphériques. Lors d'une hausse des LDL dans le sérum, le manque de récepteurs à LDL disponibles mène à une accumulation des LDL circulants et à leur passage vers l'espace sous-endothélial. [11]

Une fois dans la paroi des vaisseaux, les LDL subissent des modifications incluant l'oxydation, la lipolyse, la protéolyse et l'agrégation qui contribueront à l'inflammation. [9] La formation des LDL oxydés (oxLDL) résulte de l'exposition des LDL présent dans l'intima aux espèces réactives à l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) produites par le stress oxydatif des CE. L'accumulation des oxLDL stimule les CE à produire des molécules pro-inflammatoires telles les molécules d'adhésion et des facteurs chimiotactiques. Ces molécules participent alors au recrutement des leucocytes au site d'inflammation. Les monocytes sont d'abord attirés par les cytokines et chemokines produites par les CE. Leur premier contact à l'endothélium est favorisé par l'interaction avec la E-sélectine et la P-sélectine. Les monocytes adhèrent ensuite fermement aux CE en liant les molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 pour entrer par diapédèse dans l'espace sous-endothélial, une migration favorisée par la MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) et l'interleukine (IL)-8. [4] Les facteurs relâchés par les CE activées vont également induire

l'attachement et l'accumulation de lymphocytes T et de plaquettes qui deviendront eux-mêmes activés et relâcheront des cytokines pro-inflammatoires. [12]

Une fois recrutés dans l'intima, les monocytes se différencient en macrophages grâce au facteur de stimulation de colonie de macrophages (M-CSF) sécrété par les CE activées. Initialement, les macrophages ont un rôle protecteur, soit d'éliminer les particules oxLDL pro-inflammatoires et cytotoxiques présentes dans l'espace sous-endothélial. Par contre, l'ingestion excessive de oxLDL par les macrophages via des transporteurs spécifiques, le CD36 et le SR-A, entraîne des altérations au niveau de leurs fonctions et de leur phénotype pour devenir des cellules dites spumeuses. [11] Ces dernières produisent des cytokines et des ROS qui stimulent les CMLV à sécréter la MCP-1 et promouvoir le recrutement de monocytes circulants supplémentaires. [4] L'accumulation de cellules spumeuses et de lymphocytes T mènera au début de la formation de la plaque d'athérome initiale dite strie lipidique.

1.1.3.2 Formation et progression de la plaque : Évolution du cap fibreux

Une fois l'endothélium activé et l'inflammation installée au site de lésion, la plaque d'athérosclérose grossit et évolue en importance avec le développement d'un cap fibreux. Lors de ce processus, les macrophages spumeux relâchent des médiateurs incluant des facteurs de croissance et des cytokines qui initieront la migration des CMLV de la média vers l'intima. Les CMLV de l'intima prolifèrent et captent des oxLDL contribuant aussi à la formation de cellules spumeuses. Les CMLV produisent des matrices extracellulaires de protéines fibreuses composées de collagène, de protéoglycanes et de fibrine participant ainsi à la formation du cap fibreux.[11] Les cellules spumeuses et les lymphocytes T peuvent aussi inhiber la synthèse de matrice de collagène et la prolifération des CMLV dans le cap fibreux par la relâche de TGF- β (*transforming growth factor β*) et d'interféron- γ (IFN- γ). Les cellules inflammatoires influencent donc en même temps les processus de production et de dégradation du cap fibreux. L'accumulation des cellules spumeuses dérivées des macrophages et des CMLV conduit à la formation d'un noyau nécrotique et à l'accumulation extracellulaire de cholestérol. L'accumulation de collagène et les

phénomènes de calcification et de minéralisation induits par les CMLV permettent la stabilisation mais également la croissance en volume de la plaque d'athérome, diminuant de plus en plus la lumière résiduelle du vaisseau. L'interaction entre les lymphocytes T et les cellules spumeuses conduit à la production de médiateurs, telles des facteurs de croissance, qui stimulent la néovascularisation à la base de la plaque. Les microvaisseaux formés favorisent le recrutement de cellules immunitaires de la circulation sanguine contribuant par la suite à la déstabilisation de la plaque. [4]

1.1.3.3 Rupture de la plaque : Affaiblissement du cap fibreux et thrombose

Dans la plaque d'athérome mature, l'inflammation persiste avec la sécrétion, par les cellules spumeuses, de l'IL-1 β et du TNF- α (*tumor necrosis factor α*). Ces cytokines stimulent l'expression de FAS (*fatty acid synthase*) par les CMLV à la base du cap fibreux. Le FAS se lie au ligand FAS (FASL) exprimé à la paroi des lymphocytes T induisant la mort cellulaire des CMLV par apoptose. La sécrétion de métalloprotéinases (MMP) par les macrophages activés et les cellules T dans la matrice, incluant la stromélysine, la collagénase et la gélatinase, contribue à l'affaiblissement du cap fibreux via la dégradation de la matrice extracellulaire. La combinaison de mécanismes hémodynamiques, cellulaires et moléculaires peut entraîner la rupture du cap fibreux.[4] Suite à cette rupture, les facteurs pro-thrombotiques du cœur lipidique sont exposés aux facteurs de coagulation du sang. Ainsi, des taux élevés de facteur tissulaire (TF), relâché par les macrophages, par les CE et retrouvé dans les noyaux lipidiques, stimulent la conversion de prothrombine en thrombine. La thrombine induit alors la transformation du fibrinogène en fibrine menant à l'agrégation plaquettaire, l'activation de la coagulation et ultimement, à la thrombose. [13] Le thrombus peut alors soit obstruer l'artère ou se détacher causant par embolisation le blocage d'une artère plus distale qui peut provoquer des événements cardiaques graves, tel que la mort subite, l'infarctus aigu du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral (AVC).

Figure 2. Étapes du développement d'une lésion athérosclérotique. Le processus athérosclérotique débute par la dysfonction endothéliale où une baisse importante de production de NO et l'infiltration de LDL est observés (étape 1). Durant les étapes 2 et 3, les leucocytes sont recrutés dans l'intima par les CE activées et se transforment en cellules spumeuses suite à l'ingestion de oxLDL. Les CMLV provenant de la média forment le cap fibreux et induisent la production de matrices extracellulaires (ex. : collagène) qui renforcent la formation de la plaque et du cap fibreux (étapes 4 et 5). La rupture de la plaque expose des agents thrombotiques tel le TF qui entraîne la production de fibrine et l'attachement de plaquettes pour mener à la formation d'un thrombus (étapes 6 et 7). Image modifiée de [14]

1.1.4 Facteurs de risque reliés à l'athérosclérose

L'industrialisation et l'augmentation de la sédentarité ont eu un impact important sur la santé des populations. En effet, les changements dans le mode de vie ont amenés certaines habitudes néfastes pour la santé humaine. En plus de l'impact du sexe (genre) et

du vieillissement, est venu s'ajouter l'obésité et l'hypercholestérolémie causée par une alimentation trop riche, le diabète, l'hypertension et le tabagisme, comme « facteurs de risques » pouvant entraîner un risque accru de maladies cardiovasculaires (MCV). Chacun de ces facteurs de risque contribue à la dysfonction endothéliale et également à la progression de la plaque d'athérosclérose par différents mécanismes.

1.1.4.1 Âge et sexe

L'âge favorise principalement une dysfonction endothéliale et entraîne certains changements structurels des vaisseaux. Les vaisseaux vasculaires plus âgés présentent une vasodilatation moins efficace liée à la diminution de la production et de la biodisponibilité du NO. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la diminution du NO ne sont pas bien compris jusqu'à présent. Ils peuvent inclure la perte graduelle des mécanismes de défense antioxydants, des changements dans l'expression ou l'activité de la eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) ou la diminution de la disponibilité du NO due à la hausse de production de superoxyde ($O_2^{\cdot -}$). De plus, le vieillissement augmente la sensibilité des CE aux différents stimuli apoptotiques. En plus de contribuer à l'altération des processus angiogéniques, le vieillissement est associé à une diminution de la capacité régénératrice de l'endothélium liée à une baisse du nombre et des fonctions des CE progénitrices (CEP). A ceci, vient s'ajouter l'altération de la perméabilité de la barrière sélective de l'endothélium, empêchant un contrôle adéquat des échanges entre le sang et les tissus. [15]

Il est bien reconnu que les hommes développent la maladie cardiaque athérosclérotique en moyenne 10 ans avant les femmes, ces dernières bénéficiant d'une protection hormonale. En effet l'estrogène (E2), une hormone féminine, agit comme facteur cardioprotecteur chez la femme. Cette hormone améliore entre autres, la dilatation des vaisseaux et la fonction endothéliale en plus de réguler négativement la réponse inflammatoire. Par contre, ces effets sont perdus chez les femmes ménopausées dont la concentration en E2 chute rapidement. Ce sujet sera discuté plus en détail dans la section 1.3.

1.1.4.2 Tabagisme

Plusieurs études épidémiologiques ont révélé que le tabagisme est un important facteur de risque indépendant du développement de l'athérosclérose. [16, 17] Il est fortement associé à la hausse du taux de cholestérol sanguin. En effet, le tabagisme favorise une hausse de concentration des LDL tout en diminuant les lipoprotéines de haute densité (HDL). Le tabac promeut également la dysfonction endothéliale en augmentant la vasoconstriction des vaisseaux par l'induction de la production d'anion superoxyde, la diminution de la biodisponibilité du NO et l'augmentation de la relâche d'ET-1. [18] Plus spécifiquement, la nicotine et le monoxyde de carbone contenu dans la cigarette causent directement des lésions de l'endothélium. Par ailleurs, des extraits de fumée du tabac provoque la mort des CE vasculaires par nécrose. De plus, une étude sur les HUVEC (*human umbilical vascular endothelial cell*) a démontré une rupture du cytosquelette des cellules ainsi que des jonctions serrées, affectant par le fait même la perméabilité membranaire suite à l'exposition d'extrait de fumée. [19] Ceux-ci entraînent aussi la relâche de molécules pro-inflammatoires et induisent l'expression de molécules d'adhésion favorisant la migration transendothéliale des monocytes à travers l'endothélium endommagé. [20]

1.1.4.3 Hypertension

L'hypertension est caractérisée par une élévation de la pression sanguine systolique causée par une hausse de concentration de l'ANG II. Elle est également associée à un plus grand nombre de marqueurs inflammatoires circulants, suggérant que l'hypertension déclenche un processus inflammatoire. Une augmentation de la tension artérielle est accompagnée aussi d'un stress oxydatif important causé par la hausse de production de ROS mais également, par la diminution de la défense antioxydante. De plus, une intensification des forces de cisaillement entraîne un étirement au-delà de ses capacités, affaiblissant les parois des artères et causant des lésions. Ce stress mécanique et l'activation de facteurs humoraux tels que le système rénine-angiotensine peuvent donc engendrer un

stress oxydatif supplémentaire aggravant la dysfonction endothéliale et le processus inflammatoire impliqué dans le développement de l'athérosclérose.[21]

1.1.4.4 Diabète

Le diabète est une maladie chronique consécutive soit d'un manque de production d'insuline (type 1) ou du développement de la résistance à l'insuline (type 2). Cette condition provoque une accumulation des glucides dans le sang causant un état d'hyperglycémie. Une hausse de la glycémie induit des anomalies vasculaires qui contribuent à l'initiation de la plaque d'athérome et à sa rupture. En effet, l'hyperglycémie entraîne un déséquilibre dans l'équilibre des molécules vasoactives en diminuant la production de vasodilatateurs, telle que le NO et la prostacycline, et en augmentant la proportion de vasoconstricteurs comme l'ET-1 et l'ANG II. En plus de moduler le tonus vasculaire, l'hyperglycémie stimule une relâche accrue d'acides gras libres du tissu adipeux, entraînant un stress oxydatif important. Le diabète induit aussi l'expression de gène codant pour un grand nombre de médiateurs pro-athérogéniques tels que les molécules d'adhésion, la MCP-1, l'IL-1 β et le TNF- α . [22] De plus, le diabète augmente la production de MMP qui entraîne la dégradation des matrices de collagène menant à la rupture de la plaque d'athérosclérose. Les CE produisent également le TF en forte quantité ce qui augmente les risques de thrombose. [23]

1.1.4.5 Obésité et sédentarité

La sédentarité est invariablement associée à l'élévation de risque de MCV. L'exercice physique de modérée à élevée permet de diminuer l'incidence d'événements cardiaques et de favoriser une fonction endothéliale normale. Les effets bénéfiques sont multiples incluant l'amélioration de la pression sanguine, de la sensibilité à l'insuline ainsi que des différentes fonctions hémostatiques et inflammatoires.[24] Il permet également de réduire le poids. En effet, l'excès de poids est à la base de plusieurs maladies telles que le diabète de type 2, l'hypertension, le cancer et la plupart des MCV (insuffisance cardiaque, maladie coronarienne, athérosclérose, etc.). L'obésité est donc un facteur de risque

important puisqu'elle peut entraîner et influencer d'autres facteurs de risque de MCV connus. De plus, il a été démontré que les individus obèses ont un taux de leptine plasmatique très élevé. [25] Ce dernier est lié à la résistance à l'insuline, à l'activation et l'agrégation plaquettaire, à l'inflammation, au stress oxydatif et à la prolifération et la migration des CMLV. [26] Aussi, certains articles ont démontré que la leptine induit chez les CE vasculaires l'expression de la protéine C-réactive (CRP) [26, 27], également facteur de risque impliqué dans le développement de l'athérosclérose. [28]

1.1.4.6 Hypercholestérolémie

Des études ont démontré que l'hypercholestérolémie est un facteur de risque indépendant associé à la formation de la strie lipidique et également à sa conversion en plaque plus complexe avec le développement du cap fibreux. [29] L'hypercholestérolémie consiste en une élévation du taux de cholestérol sanguin caractérisée par une augmentation du ratio des LDL-C par rapport au HDL-C. Ce déséquilibre entraîne de nombreuses complications au niveau de l'endothélium vasculaire. En effet, le cholestérol excédant passe dans l'espace sous-endothélial pour subir une oxydation. Les oxLDL peuvent alors provoquer la production ou la relâche de cytokines, inhiber les fonctions vasodilatatrices des CE et stimuler la production de facteurs de croissance. Ils sont également ingérés par les macrophages, ce qui provoque des changements phénotypiques et fonctionnels. Les oxLDL entraînent aussi une diminution de la vasodilatation liée à une augmentation de la sensibilité des CMLV aux agonistes contractiles. [30]

1.1.4.7 Biomarqueurs de l'inflammation – protéine C-réactive

L'athérosclérose est caractérisée par un processus pro-inflammatoire non spécifique accompagné d'une réponse systémique. Des études prospectives récentes ont révélé que plusieurs biomarqueurs de l'inflammation tels que le sCD40L, le Lp-PLA2 (*lipoprotein-associated phospholipase A2*) et le sérum amyloïde A (SAA) pouvaient être des prédicteurs du risque de MCV. Parmi les multiples biomarqueurs étudiés, la CRP est une des seules protéines plasmatiques ayant toutes les caractéristiques nécessaires pour être considéré

comme facteur de risque indépendant. [31] En effet, des études ont tout d'abord démontré une forte corrélation entre le taux plasmatique de CRP et le développement de MCV chez des individus d'apparence saine. [32] Le potentiel d'association entre des concentrations systémiques élevées de CRP et les pronostiques cardiovasculaires ont été illustrés pour la première fois chez des patients présentant un syndrome coronarien aigu. [33] La CRP représente alors un marqueur clinique robuste grâce à sa stabilité analytique, ses résultats reproductibles et son essai hautement sensible très précis mesurant son taux circulant. [34] Elle est maintenant considérée comme étant le biomarqueur de l'inflammation le plus efficace pour prédire ces risques. [35] De plus, certaines évidences suggèrent que la CRP participerait directement à l'athérogénèse. [36] Ce sujet sera plus approfondi dans la prochaine section.

1.2 La protéine C-réactive (CRP)

1.2.1 Biomarqueur de l'inflammation et facteur de risque de maladies cardiovasculaires

Dans les années 1990, les facteurs de risque de MCV établis par plusieurs études épidémiologiques et formant le « Framingham Risk Score » (FRS) sont utilisés comme cibles thérapeutiques dans la prévention primaire et secondaire d'évènement cardiaque. Par contre, plusieurs patients atteints de syndromes coronariens aigus ne présentaient aucun de ces facteurs ou un risque faible selon le FRS. Pour augmenter la valeur prédictive du risque de maladies cardiaques, plusieurs investigateurs ont cherché de nouveaux facteurs de risque reflétant mieux différents stades de l'athérogénèse et permettant d'optimiser l'identification des patients à risque élevé. C'est en se basant sur des études de Rudolf Virchow effectuées à la moitié du 19^e siècle, qu'une corrélation entre l'inflammation et les MCV est établie. En effet, celles-ci ayant démontré que l'inflammation pouvait jouer un rôle dans la pathogenèse de l'athérosclérose, les scientifiques se sont tournés vers des marqueurs d'inflammation telle que la CRP.

À travers de nombreuses études, cette protéine a démontré un potentiel comme marqueur de risque d'évènements cardiaques récurrents chez des patients atteints ou non d'une maladie coronarienne stable. Une association entre le niveau de CRP et les causes de mortalité cardiovasculaires fut établie. [37] En 1997, le « Physicians' Health Study », une étude à grande échelle sur un peu plus de 22 000 hommes, a démontré que la concentration basale de CRP était significativement plus élevée parmi les patients ayant subi un infarctus du myocarde ou un AVC. [38] Cette étude démontre que la CRP est plus efficace pour prédire les évènements vasculaires que tout autre biomarqueur de l'inflammation incluant le fibrinogène, l'ICAM-1 soluble (sICAM-1), le VCAM-1 soluble (sVCAM-1), le SAA et l'IL-6. Des méta-analyses épidémiologiques sur des hommes et des femmes d'apparence saine confirment que la CRP représente un facteur prédictif indépendant et fort de risque futur de MCV et que ce biomarqueur fournit des informations pronostiques

complémentaires à celles obtenues par le FRS traditionnel. [39-42] La méthode de détection « hautement sensible » (hsCRP, *high sensitivity*) très simple et peu coûteuse pour mesurer la concentration plasmatique de la CRP, a permis de faciliter l'application clinique de ce marqueur.

En 2003, l'AHA (*American Heart Association*) et le Centre de prévention et de contrôle des maladies (CDC) établissent une ligne directrice pour l'utilisation de la CRP comme marqueur de risque pour les MCV. Une approche simplifiée pour mesurer est alors proposée où les taux de <1mg/L, 1-3mg/L, et >3 mg/L correspondent aux groupes de risques vasculaires faibles, modérés et élevés. À ce jour, la hsCRP peut donc prédire une large gamme de MCV tels les infarctus du myocarde, les maladies coronariennes, les AVC, les maladies artérielles périphériques et la mort subite. [43]

1.2.2 Propriétés de la protéine

1.2.2.1 Structure et isoformes

Membre d'une famille de protéines hautement conservées, les pentraxines, la CRP est formée de cinq sous-unités globulaires identiques dites protomères de 23,028 Daltons disposées symétriquement autour d'un pore central (figure 3). La CRP pentamérique forme une protéine d'environ 115 kDa et son gène est situé sur le chromosome 1. [32] Les protomères sont composés de 206 acides aminés assemblés en deux feuillets bêta antiparallèles. Les protomères sont reliés ensemble par des liaisons non covalentes de ponts d'hydrogènes et d'interactions électrostatiques. Sa structure est très similaire à celle du sérum amyloïde P (SAP), autre protéine de la famille des pentraxines. [44]

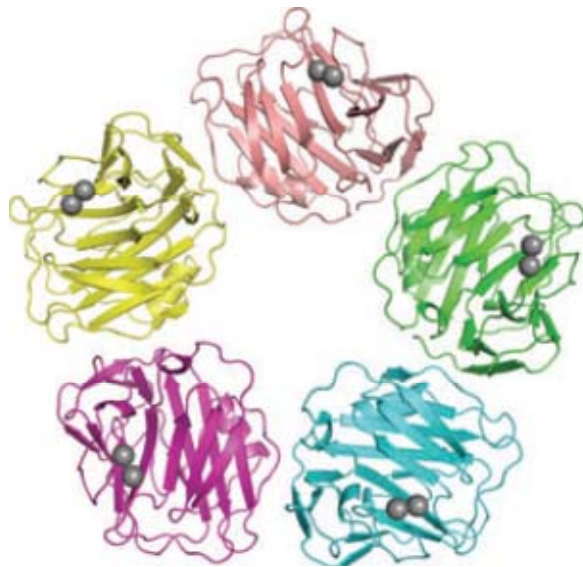


Figure 3. Structure pentamérique de la CRP. Structure 3D cristallographique en rayons X de la molécule de CRP avec les deux ions calcium liés à chacun des protomères. Image tirée de [45]

La CRP a tout d'abord été décrite par les laboratoires d'Oswald Avery du Rockefeller Institute à New York.[46] Découverte en 1929 par William Tillett et Thomas Francis, deux chercheurs du laboratoire d'Avery, la protéine est décelée chez un patient souffrant d'une infection inflammatoire aiguë à la *Streptococcus pneumonia*. [47] Cette protéine inconnue est alors nommée la protéine C-réactive dû à sa réactivité avec les résidus de phosphatidylcholine (PCh), constituant des polysaccharides de bactéries et de champignons ainsi que des membranes cellulaires de cellules activées ou en apoptose. En fait, à pH physiologique, la PCh est le ligand auquel la CRP se lie le plus fortement, cette liaison étant dépendante du calcium. Elle comporte également des sites de liaison à la C1q, sous-composante du complexe C1 impliquée dans l'activation classique du complément, [48] et aux récepteurs d'immunoglobuline FcγRI (*Fc receptor gamma I*, CD64) et FcγRIIa (*Fc receptor gamma IIa*, CD32). [49] La protéine comporte deux faces, soit une face de « reconnaissance » qui exhibe les sites de liaison au PCh et une face « effectrice » constituée des sites de liaison au C1q et aux FcγR. En condition inflammatoire, la CRP

subit un changement conformationnel qui consiste en une rotation de ces protomères autour de leur axe, exposant la face effectrice et les sites de liaison au C1q et FcγR favorisant ainsi l'interaction avec leurs ligands. [44] Il a récemment été démontré qu'à pH acide, caractéristique d'un site d'inflammation, la CRP pouvait également lier le facteur H du complément, les oxLDL, le c3b, un fragment amyloïde bêta 1-38 et l'albumine circulante. [50] La CRP peut aussi lier certains constituants nucléaires telles les ribonucléoprotéines. [50]

La CRP sous sa forme naturelle est dite native ou pentamérique (pCRP), puisqu'elle est constituée de cinq sous-unités. Sous cette forme, cette protéine du sérum est très soluble et stable dans des conditions physiologiques. Par contre, certaines évidences suggèrent que la protéine pentamérique peut subir une dissociation en condition inflammatoire et créer cinq unités indépendantes, formant la CRP monomérique ou modifiée (mCRP). Cette dissociation a été démontrée *in vitro* pour la toute première fois par Potempa et al.[51] En effet, en présence de chélateur d'urée, en absence de calcium, en condition acide ou à température élevée, le processus de dissociation est enclenché. La forme monomérique expose alors des néoépitopes différents de sa forme native et subit un changement de conformation dans sa structure secondaire. Ainsi, la proportion prédominante initiale de feuillet bêta diminue et une augmentation proportionnelle d'hélices alpha est observée. De plus, la forme modifiée de la protéine est caractérisée par une diminution de sa solubilité et exhibe des caractéristiques électrophorétiques différentes comme un point isoélectrique plus bas se situant entre 6.4 et 5.4. [51, 52] Cette forme permet aussi l'expression d'une nouvelle activité antigénique. [53] Une étude a récemment démontré que la transition d'une forme à l'autre peut être un processus plus complexe. La dissociation de la CRP native dépend fortement des conditions environnantes, mais également des ligands auxquels elle se lie. En effet, l'équipe de recherche de Jing Zhao a observé que la protéine pentamérique se liant aux liposomes ou aux membranes cellulaires exposant la PCh exprime les néoantigènes des sous-unités de sa forme monomérique tout en gardant sa conformation native. Une nouvelle molécule intermédiaire est alors créée, la mCRP membranaire

(mCRP_m). [54] Les auteurs de cette étude suggèrent que cette étape précéderait la séparation physique des cinq sous-unités. Par contre, comme décrit dans l'étude, un microenvironnement hydrophobique, une fluidité importante de la bicouche lipidique ainsi qu'une multitude de points d'attache sont des éléments nécessaires pour entraîner une dissociation efficace de la protéine. Le processus de dissociation de la CRP a également été étudié par une autre équipe qui a établi que les lysophosphatidylcholines présents sur les plaquettes activées médient le changement de conformation. [55] En résumé, l'isoforme monomérique de la CRP est générée *in vivo* lorsque la pCRP se lie à la surface de membranes endommagées tels que les plaquettes activées, les microparticules apoptotiques dérivées des plaquettes, les liposomes contenant le PCh et les oxLDL.[55] [56, 57]

1.2.2.2 Régulation de l'expression de la CRP

La principale source de CRP plasmatique est le foie. La régulation de sa production par les hépatocytes est modifiée lors d'une réponse inflammatoire aiguë, une infection ou une blessure vasculaire. Sa concentration dans le sérum humain peut alors passer de 0,8 ug/ml, concentration moyenne retrouvé généralement à travers la population, [58] à plus de 500 ug/ml en 24-72h. [59] Au niveau du foie, l'induction transcriptionnelle de la protéine pentamérique est régulée principalement par l'IL-6, l'agoniste le plus important de la production de CRP. L'IL-6 peut agir en synergie avec d'autres facteurs, plus particulièrement l'IL-1 β et le TNF- α . Au niveau mécanistique, l'induction de l'expression génique de la CRP requiert la liaison de l'IL-6 à son récepteur, l'IL-6R, menant à la phosphorylation et l'activation des JAKs (*Janus-activated kinases*). Ces dernières activent les protéines C/EBPs (*CCAAT/enhancer-binding proteins*) et phosphorylent le facteur de transcription nucléaire STAT3 (*signal transducer and activator of transcription factor 3*). L'IL-6 induit également l'activation du NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) qui participe au processus d'expression de la CRP en facilitant la transduction des signaux médiés par les C/EBPs. [60] Une étude récente a démontré que l'IL-17 participait aussi à la régulation de la production de CRP par les hépatocytes et les CMLV humains via l'activation de la P38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et de ERK1/2 (*extracellular signal-regulated*

kinase) dépendante du NF- κ B et du C/EBP β . [61] L'expression de la protéine pentamérique est régulée principalement au niveau transcriptionnel, mais des mécanismes post-transcriptionnels peuvent également jouer un rôle dans sa concentration plasmatique. Sous des conditions physiologiques, la CRP est synthétisée à faible taux et assemblée en pentamère dans le réticulum endoplasmique où elle est retenue par des carboxylestérases. Lors d'une inflammation de phase aiguë, la CRP est expulsée plus rapidement du réticulum endoplasmique, passant d'un temps de sécrétion de 18 h à 1h15 min. [44]

Récemment, il a été démontré que la CRP était également produite localement par d'autres types cellulaires. Cette hypothèse a été développée suite à l'observation de la colocalisation de la CRP avec les protéines du complément dans la plaque athérosclérotique d'artères coronaires humaines. Les chercheurs ont démontré que cette colocalisation ne serait pas une conséquence de la déposition de la CRP circulante mais bien le résultat d'une production locale. [62] De plus, Yasojima et al. illustrent dans leur étude réalisée sur des tissus humains que le taux de production d'ARNm de la CRP dans la plaque d'athérosclérose est 10,2 fois plus élevé que dans une artère normale et 7,2 fois plus grand que dans le foie. [63] Par la suite, la synthèse de la CRP par les différents types de cellules vasculaires a été investiguée. Des études ont établies que les CMLV, les macrophages ainsi que les CE provenant d'artères coronaires humaines ont la capacité de produire de la CRP en réponse à un stimulus inflammatoire.[64, 65]

1.2.2.3 Fonction biologique au niveau du système immunitaire

Le principal rôle biologique de la CRP chez l'humain est de protéger l'organisme contre les infections. Étant une protéine du système immunitaire innée, ses principales fonctions sont d'activer le système du complément, d'induire la phagocytose par les macrophages et de favoriser l'activation leucocytaire afin d'éliminer les pathogènes, les microorganismes et les cellules endommagées et apoptotiques de l'hôte. [60]

Comme mentionné ci-haut, la CRP interagit principalement avec la PCh exprimée par les bactéries, les champignons et les cellules eucaryotes. Plus spécifiquement, la PCh est située à la tête des sphingomyélines et des phospholipides des membranes cellulaires

des eucaryotes, mais n'est pas accessible à la CRP en condition normale. Les phospholipides peuvent donc interagir avec la protéine pentamérique seulement lorsque les cellules sont activées, endommagées ou en apoptose. La CRP est tout d'abord une protéine de phase aiguë, mais agit également face aux réponses inflammatoires chroniques. Grâce à son interaction avec les récepteurs d'immunoglobulines FcγRs, FcγRI et FcγRIIa, la CRP induit la réponse des cellules phagocytaires et participe ainsi à l'élimination des microorganismes.

Un site spécifique de liaison à la C1q du complexe C1 permet également l'activation de la voie classique du complément par la CRP, favorisant ainsi la défense contre les pathogènes. En effet, l'interaction de deux molécules de CRP adjacentes à une molécule de C1q active le complexe C1 et génère l'enzyme C3 convertase, déclenchant le processus initial de l'activation du complément. Les fragments produits lors des différents clivages des composants C1 à C4 agissent alors comme signaux diffusibles et provoquent une réponse inflammatoire. Le complexe immunitaire induit normalement les deux phases du système de complément, soit la phase précoce (composants C1 à C4) et la phase tardive ou effectrice (composants C5b à C9). La CRP active efficacement la première phase du complément, mais n'induit que faiblement la phase tardive. [60] De plus, elle diminue l'activité de la voie alternative et la voie des lectines. Cette régulation négative du système du complément est en partie reliée à la liaison de la CRP au facteur H. L'interaction de la CRP avec cette protéine régulatrice du complément permet la dissociation de la C3/C5 convertase et l'inhibition de la voie alternative diminuant ainsi l'intensité de la réaction inflammatoire. [66] Également, une étude utilisant du plasma humain a démontré une interaction entre la CRP et le C4BP (*C4-binding protein*), un inhibiteur de la voie classique du complément. Les auteurs suggèrent que la protéine pentamérique limite l'activation excessive du complément par son interaction avec le facteur H et le C4BP. [67] Le déclenchement d'une inflammation aiguë est alors favorisé tout en régulant l'intensité et la progression de cette inflammation par l'inhibition de la phase tardive de la voie classique et des voies alternatives du système du complément.

1.2.2.4 Récepteurs et voies d'activation

La CRP peut lier une grande variété de ligands tels que les polysaccharides des pneumocoques, les cellules activées et apoptotiques, les particules ribonucléaires ainsi que les facteurs du complément. Les récepteurs de la protéine ont été identifiés sur les cellules mononucléaires, les neutrophiles et plus récemment sur les CE humaines. Comme mentionné ci-haut, la CRP lie les récepteurs d'immunoglobulines FcγRs des leucocytes humains, soit le FcγRI ou CD64 à faible affinité et majoritairement le FcγRIIa ou CD32 à forte affinité. [68] Les récepteurs FcγRs sont des récepteurs d'immunoglobuline G et comportent deux classes, soit les récepteurs à motif ITAM et les récepteurs à motif ITIM. Les récepteurs ITAM (FcγRIIa ou CD32) en liant la CRP permettent le déclenchement de la phagocytose, la sécrétion de cytokines et activent également les granulocytes favorisant l'élimination de plusieurs pathogènes. Les récepteurs à motif ITIM (FcγRI ou CD64) possèdent un rôle inhibiteur qui contrôle et diminue l'activité pro-inflammatoire induite par les récepteurs ITAM. [49] Devaraj et al. confirment que la CRP lie, à la surface des CE, le CD32 et le CD64 par lesquels sont médiés ses effets biologiques. En effet, l'augmentation de l'expression de l'IL-8, des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 ainsi que la diminution de l'activité eNOS par les CE aortiques humaines (HAEC) médiées par la CRP sont abolies par l'utilisation d'anticorps dirigés contre le CD32 et CD64. [69] De plus, la liaison de la CRP humaine au LOX-1 (*Lectin-like oxidized LDL receptor-1*), récepteur des oxLDL des CE jouant un rôle important dans la dysfonction endothéliale, a également été démontrée. [70] La distribution histologique de LOX-1 étant différente de celles des récepteurs CD32 et CD64, ceci suggère que la CRP exercerait une fonction distincte en liant le récepteur des oxLDL et pourrait jouer un rôle important dans la progression de l'athérosclérose. [71]

Plusieurs études *in vitro* ont tenté de démontrer les différentes voies signalétiques possibles de la CRP. Cette dernière exerce ses effets moléculaires particulièrement via l'activation des protéines MAPK impliquées dans les mécanismes d'activation inflammatoires. Par exemple, la dilatation des artères coronaires porcines dépendantes du

NO est inhibée par la CRP via l'activation de la P38 MAPK. [72] De même, la protéine induit la production d'IL-8 chez les HAEC via la P38 MAPK, mais également via la ERK1/2 et le JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). [73] La voie de ERK 1/2 est aussi activée par la CRP chez les leucocytes. En effet, la protéine induit par cette voie l'expression des MMP, impliquées dans la déstabilisation de la plaque d'athérome, ainsi que le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), important facteur pro-athérogénique. Des études récentes ont démontré que la CRP humaine active le TLR-4 (*toll-like receptor 4*) via la P38 MAPK chez les CMLV de rat pour initier une réponse inflammatoire.[74] [75] De plus, la voie de la Rho/Rho-kinase reconnue comme signal inflammatoire jouant un rôle dans le remodelage vasculaire et l'athérosclérose, est activée par la CRP humaine déclenchant l'induction de l'expression de la PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) chez les BAEC (*bovine aortic endothelial cell*).[76] La plupart des voies activées par la CRP humaine culminent vers l'activation du NF- κ B, facteur de transcription nucléaire qui joue un rôle important dans l'inflammation en favorisant l'expression de gènes pro-inflammatoires. [59] [77]

1.2.3 Effets potentiels proathérogéniques et athérothrombotiques de la CRP sur les cellules vasculaires

Plusieurs évidences démontrent que la CRP participe au développement de la lésion athérosclérotique via son habileté à induire et accélérer plusieurs étapes de l'athérogénèse (figure 4). En effet, plusieurs groupes de chercheurs suggèrent que la protéine favorise un phénotype pro-inflammatoire et pro-athérogénique de l'endothélium à différents stades du développement de l'athérosclérose. Tout d'abord, la CRP cause une dysfonction endothéliale par la dérégulation de l'homéostasie vasculaire, favorisant une vasoconstriction des vaisseaux. Une diminution de l'ARNm et de l'expression protéique de l'enzyme eNOS ainsi qu'une inhibition de son activité est entraînée par la CRP, résultant en une réduction importante de la production et de la biodisponibilité du NO. Les mécanismes impliqués dans ce phénomène consistent, entre autres, en une diminution de la stabilité de

l'ARNm de eNOS [78] et une déphosphorylation de la Ser1179 de l'enzyme. [79] De plus, la CRP humaine provoque un découplage de l'enzyme eNOS, entraînant une augmentation de la production de superoxydes par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NAD(P)H) oxydase, et donc un stress oxydant pour les CE.[80] Une étude récente *in vivo* chez le rat démontre que le découplage de la eNOS par la CRP serait causé par une réduction de la dimérisation de l'enzyme et une diminution de la biosynthèse de tétrahydrobioptérine (BH4), un cofacteur important de la réaction enzymatique de la eNOS. [81] Également, la protéine stimule la relâche d'ET-1 et diminue la production de prostacycline par les CE humaines, contribuant par le fait même à la vasoconstriction de l'endothélium.[82] [83]

L'activation endothéliale menant au recrutement des cellules inflammatoires dans l'intima et la formation de la plaque est également influencée par l'activité biologique de la CRP. Cette étape de l'athérosclérose est caractérisée par l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, ICAM-1 et VCAM-1 et de la E-sélectine induites par la CRP humaine. [84] L'induction de l'ARNm et de l'expression protéique de l'IL-8 via l'activation du NF-kB et de la sécrétion de MCP-1 par la protéine pentamérique contribuent à la transmigration des monocytes vers l'espace sous-endothéliale. [84, 85] Une hausse de l'expression de l'intégrine CD11b et de CCR2 (*CC-chemokine receptor-2*), le récepteur de MCP-1 sur les monocytes, a également été reportée suite à une incubation de ces cellules d'origine humaine avec la CRP.[86] De plus, une augmentation de l'adhésion des monocytes à l'endothélium induite par la protéine autant sous des conditions statiques que face à des forces de cisaillement a été confirmée par une étude *in vitro* de Devaraj et al. sur des cellules humaines. [87] La CRP interagit aussi avec les LDL qui transmigrent à travers l'endothélium et mènent à la formation des cellules spumeuses. En effet, une étude utilisant des cellules isolées de sang humain suggère que la protéine participe à l'induction de l'opsonisation des oxLDL par les macrophages. [88] Cette hypothèse est confirmée dans une étude *in vivo* où la CRP favorise l'ingestion des oxLDL et l'accumulation des esters de cholestérol intracellulaires dans les macrophages de rat. [89] De plus, une hausse de la

production d'ARNm et de l'expression protéique de LOX-1 par les HAEC induite par la CRP résulte en une augmentation de l'adhésion des monocytes à l'endothélium et de l'ingestion des oxLDL par ces cellules.[90] La déposition et l'oxydation des lipides augmentés par la CRP induisent la production de ROS par les cellules présentes dans la lésion athérosclérotique humaine, incluant les macrophages et les CMLV, amplifiant la réponse inflammatoire dans l'intima. [91]

Les CMLV participent à la transition de la plaque athérosclérotique initiale à la formation du cap fibreux. La CRP joue également un rôle prépondérant dans cette phase en favorisant la prolifération, la migration et le remodelage des CMLV par l'augmentation de l'expression du récepteur de l'angiotensine de type I (AT1-R) par la voie de ERK 1/2. [91, 92] L'AT1-R favorise la production de collagène et d'élastine pouvant contribuer à la stabilisation de la plaque. Cependant, la CRP peut jouer également un rôle important au niveau de la rupture du cap fibreux. En effet, la synthèse des MMP est augmentée par la CRP dans les CE et les macrophages humains, contribuant à la dégradation des matrices extracellulaires et à l'instabilité de la plaque. [93, 94] La CRP induit aussi l'activation de la cascade de coagulation et l'apoptose des cellules incluant les CMLV d'artères coronaires humaines. [95] L'expression du TF par les CE, les CMLV et les macrophages via l'activation du NF-kB est également favorisée, induisant l'activation et l'adhésion des plaquettes pour mener à la formation d'un thrombus. [92] Le processus de fibrinolyse est également altéré par la CRP due à l'augmentation de PAI-1 et à l'inhibition du t-PA des CE. [96]

Les CEP, provenant de la moelle osseuse, ont la capacité de circuler, proliférer et de se différencier en CE matures. La mesure des CEP circulantes est utilisée pour évaluer le risque de MCV futur puisqu'il a été démontré que la diminution du nombre et de la fonction des CEP est associée à une hausse d'évènements cardiaques. Des études cliniques rapportent que les facteurs de risque de l'athérosclérose, dont la CRP, sont associés à un plus faible taux circulant de CEP. [97, 98] Une étude menée par Verma et al. effectuée avec des échantillons sanguins d'hommes volontaires a établi que la CRP inhibe la

différenciation, la survie et la fonction des CEP, trois composants essentiels à l'angiogenèse. Cette étude démontre que la CRP exerce cet effet, entre autres, par la réduction de l'expression de la eNOS, réduisant la disponibilité du NO. Ce mécanisme favorise l'apoptose des CEP et altère leur fonction angiogénique en réduisant leur capacité à former des tubules. [99] Une étude récente du même groupe établit sur des CEP provenant d'une source identique observe une hausse de production de ROS en fonction de la dose de CRP et par le fait même, l'augmentation de l'apoptose des CEP.[100] De plus, la protéine pentamérique inhibe la sécrétion de l'IL-8 par les CEP, une cytokine jouant un rôle important comme médiateur de l'activité mitogénique paracrine des CEP et de l'angiogenèse. En exerçant un effet négatif sur la fonction des CEP, la CRP altère aussi la réparation vasculaire et la néovascularisation.

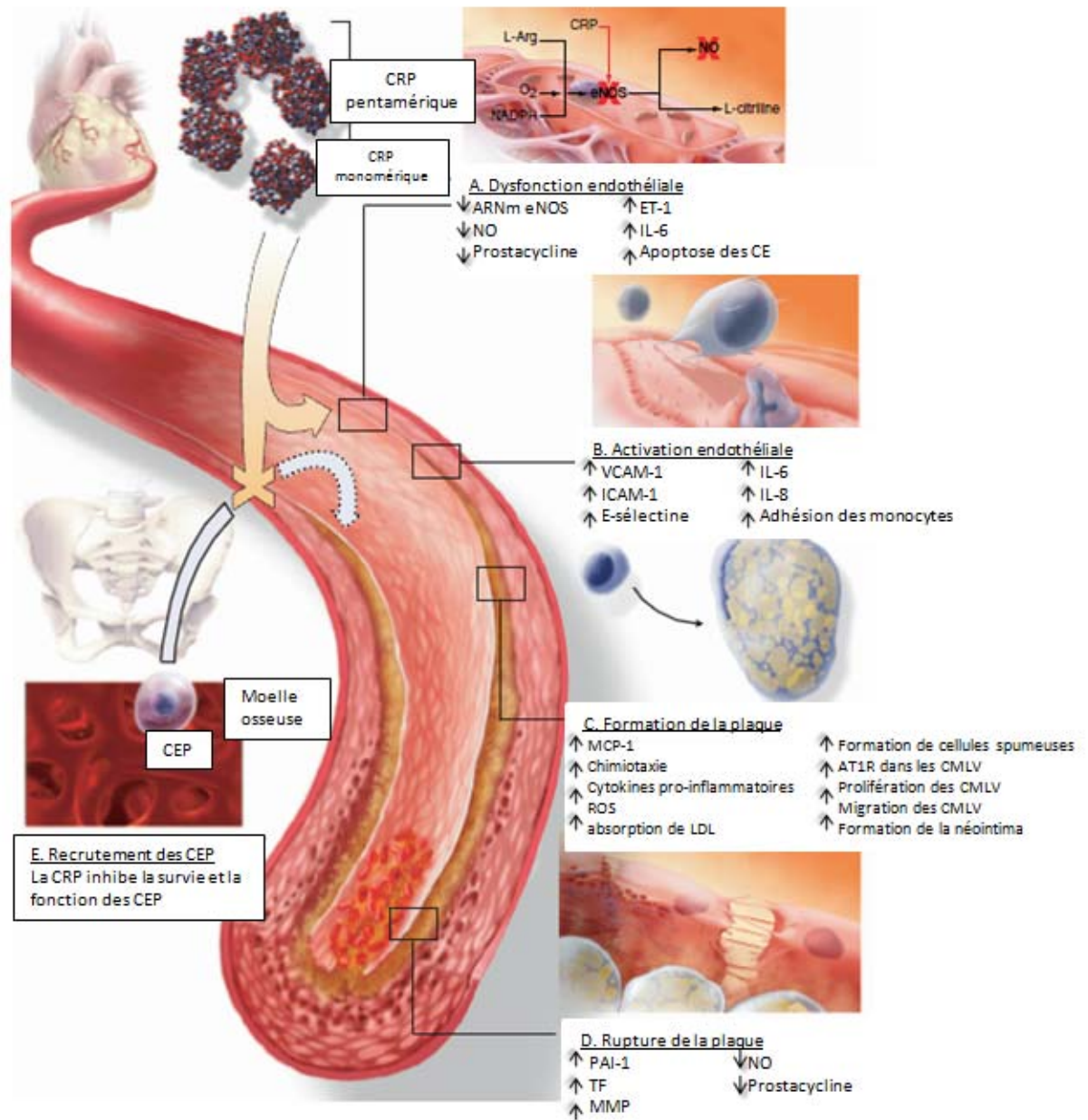


Figure 4. Effets pro-athérogéniques de la CRP dans les différents stades de l'athérosclérose. La CRP provoque une dysfonction (A) et une activation endothéliale (B) menant à la formation de la plaque d'athérome (C) et à sa rupture (D). La CRP inhibe le recrutement des CEP de la moelle osseuse au site de lésion en diminuant leur survie et leurs fonctions (E). Image traduite de [101].

Des équipes de recherche ont également eu recours à des études *in vivo* pour investiguer le rôle de la CRP dans la pathologie de l'athérosclérose. Tout d'abord, Danenberg et al. ont observé que les souris transgéniques pour le gène de la CRP (CRPtg) humaine, présentaient une concentration plasmatique de CRP de 18,6 mg/L comparées aux souris de type sauvage dont le taux était indétectable. Suite à une blessure artérielle, une occlusion thrombotique complète de l'artère fémorale est observée chez 75 % des souris CRPtg comparativement à 17% chez les souris de type sauvage. [102] Aussi, une étude démontre que des souris CRPtg croisées ApoE^{-/-} (*apolipoprotein E-Knockout*) présentent une augmentation significative de lésions athérosclérotiques et une dysfonction endothéliale avec une hausse de production de ROS. [103, 104] Une autre étude utilisant des souris CRPtg exprimant le gène de la CRP de lapin démontre une diminution de la synthèse de NO et une atténuation de la réendothélisation des souris. [105] Par contre, des études subséquentes ont démenti le rôle pro-athérogénique de la CRP observé chez la souris et remis en question la validité de ce modèle animal. En effet, chez des souris ApoE^{-/-}, la protéine ne démontrait pas d'effets pro-athérogéniques ni athéroprotectives. [106, 107] L'utilisation du modèle de souris pour étudier les effets biologiques de la CRP *in vivo* est donc controversée. Le modèle de rat est préféré au modèle de souris pour plusieurs raisons. En effet, chez la souris, la CRP n'agit pas en tant que protéine de phase aiguë dans l'inflammation, mais possède au contraire un rôle anti-inflammatoire. De plus, la CRP du rat partage 79 % d'identité avec la CRP humaine et l'injection de cette dernière dans le rat augmente de 40 % l'ampleur d'un infarctus.[10] Aussi, la protéine pentamérique humaine a démontré un rôle pro-inflammatoire chez le rat par l'augmentation de l'expression de iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) et de certaines cytokines. De plus, la CRP humaine active le complément du rat, mais pas celui de la souris. [10] Récemment, un autre modèle animal, le lapin transgénique exprimant la CRP humaine, est proposé où l'induction de la formation de thrombus dû à la CRP après une blessure néointimale fut démontrée. [108] Les résultats obtenus *in vivo* chez la souris doivent donc être traités avec attention et d'autres études chez le rat devront être réalisées afin d'évaluer les fonctions de la CRP humaine *in vivo*.

Certains articles tendent à remettre en question le rôle causal pro-athérogénique de la CRP. Une récente étude randomisée mendélienne, entre autres, suggère que son implication dans les MCV est très peu probable selon l'analyse de variants génétiques de la protéine. [109] Les MCV, telle l'athérosclérose, sont des maladies très complexes dont le phénotype est en partie influencé par des facteurs génétiques, mais également par l'environnement et le style de vie. Comme le décrit Éric B. Rimm, la consommation d'alcool, le tabagisme et la sédentarité contribuent substantiellement aux risques de MCV et les bénéfices reliés à de meilleures habitudes de vie se reflètent par une réduction de l'inflammation marquée par la diminution du taux de hsCRP. [110] La génétique mendélienne estime exclusivement l'impact de l'hérédité sur un facteur. Cependant, le niveau plasmatique de base de hsCRP chez l'humain reflète aussi l'influence environnementale. L'effet de variant génétique serait donc moins susceptible d'affirmer sans équivoque l'influence de la CRP sur les MCV. [110] Une telle étude devrait plutôt être incorporée dans un modèle multifactoriel pour améliorer la prédiction des risques cardiaques. À l'inverse, la plupart des études portant sur cette protéine tendent à démontrer son impact sur l'établissement et le maintien de l'inflammation au niveau des lésions athérosclérotiques. En fait, la CRP est impliquée, entre autres, dans le développement de l'athérosclérose par l'augmentation de sa concentration locale aux sites de blessures vasculaires, malgré un taux de hsCRP constant. [63] La mesure de CRP plasmatique peut donc permettre d'identifier un certain risque relié aux MCV, mais la protéine pentamérique agit également directement au niveau des cellules vasculaires des artères humaines où elle promeut l'inflammation et le développement de l'athérosclérose, comme décrit précédemment. Comme l'inflammation est une composante intégrale de cette maladie, la CRP exposant un important rôle athérogénique et prothrombotique représente donc une cible thérapeutique pour la prévention et le traitement de maladies cardiaques tel que l'athérosclérose.

1.3 L'estrogène : protection vasculaire

1.3.1 Biosynthèse et actions physiologiques des estrogènes

L'estrogène ou 17β -estradiol est une hormone stéroïdienne féminine dérivée du cholestérol. Tout comme la testostérone, la formation de l'estrogène résulte d'une série de transformations enzymatiques du cholestérol vers l'intermédiaire clé, l'androstènedione (figure 5). L'estrogène est finalement formé par une réaction catalysée par un complexe enzymatique de l'aromatase mono-oxygénase P450 (cyp19) à partir de ses précurseurs, soit l'androstènedione et la testostérone. Ces deux formes hormonales ne sont présentes que très brièvement chez la femme puisqu'elles sont immédiatement transformées par l'aromatase, une enzyme présente qu'en très faible quantité chez l'homme. En voie alternative, l'androstènedione est aromatisée en estrone qui est subséquemment convertie en estradiol.

[111]

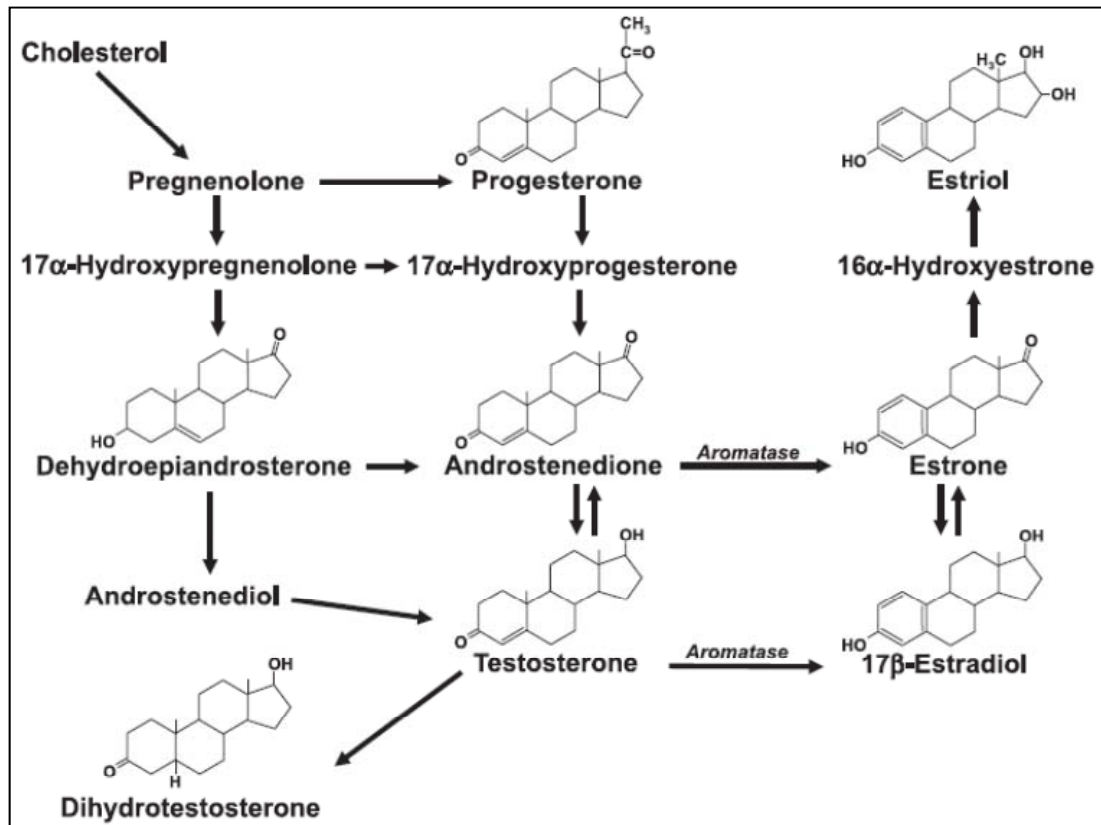


Figure 5. Formation des hormones sexuelles stéroïdiennes. Le cholestérol, à l'origine des différentes hormones stéroïdiennes, subit une suite de réactions enzymatiques pour former les précurseurs des hormones féminines, l'androstènedione et la testostérone. Par l'activité d'une aromatasase, ces précurseurs sont convertis en estradiol, en estrone et en estriol. Image tirée de [111].

Les trois principales formes d'hormone féminine sont l'estradiol (E2), l'estrone (E1) et l'estriol (E3). Chez la femme, l'E2 est la principale forme d'estrogène circulant. Les sources primaires de l'estrogène sont les cellules de la thèque et de la granulosa des follicules ovariens, du corps jaune et du placenta chez la femme et des cellules de Leydig des testicules chez l'homme. La concentration sérique d'E2 varie considérablement en fonction du cycle menstruel pouvant varier de 40 pg/ml lors de la phase folliculaire à 600 pg/mL dans la phase pré-ovulatoire. Bien que les estrogènes soient présents dans les deux sexes, une quantité significativement plus importante se retrouve chez les femmes que chez

les hommes. Cependant, la concentration plasmatique de l'E2 chez les hommes est comparable à celle des femmes post-ménopausées, soit de 5 à 20 pg/ml. [112] En fait, après la ménopause, l'épuisement des follicules ovariens mène à la réduction de la production d'E2 par les ovaires. Le faible taux d'E2 disponible provient alors essentiellement de sources secondaires telles le foie, le tissu adipeux et les muscles. [113]

L'E2 favorise le développement des caractères sexuels secondaires, la maturation des gonades et joue un rôle critique dans la régulation du cycle menstruel et de la grossesse. Au niveau du foie, l'E2 augmente les récepteurs aux lipoprotéines, résultant en une diminution de la concentration sérologique de LDL-cholestérol. [114] De plus, cette hormone féminine augmente le potentiel de coagulation, [113] améliore l'apparence de la peau par une hausse de production de collagène, [115] protège contre le cancer du côlon [116] et exerce une action neuroprotective. En effet, chez les femmes post-ménopausées, la déficience d'E2 est associée à un déclin des fonctions cognitives et à un risque élevé de maladie d'Alzheimer. [117] Un autre rôle important de l'E2 qui sera discuté plus en détail dans la section 1.3.3 est son activité cardioprotectrice. [113]

1.3.2 Les récepteurs estrogéniques

1.3.2.1 Structure

Les récepteurs estrogéniques (RE), RE- α et RE- β , appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ces deux protéines sont constituées de cinq régions, communes à tous les récepteurs nucléaires (figure 6). Ces régions nommées A/B, C, D, E et F participent à la formation des domaines fonctionnels. En effet, les RE sont composés de trois domaines fonctionnels indépendants comprenant le domaine NH₂-terminal ou A/B qui possède des fonctions de transactivation, le domaine de liaison à l'ADN (DBD, *DNA binding domain*) ou C et le domaine de liaison du ligand (LBD, *ligand-binding domain*) ou D/E/F. La liaison d'un ligand aux récepteurs RE déclenche un changement conformationnel menant à différents événements qui engendrent une modulation du taux de transcription des

gènes régulés par l'E2. Ces événements incluent la dimérisation des récepteurs, leur liaison à l'ADN, le recrutement et l'interaction avec des co-activateurs, co-répresseurs ou d'autres facteurs de transcription et la formation d'un complexe de pré-initiation. [118]

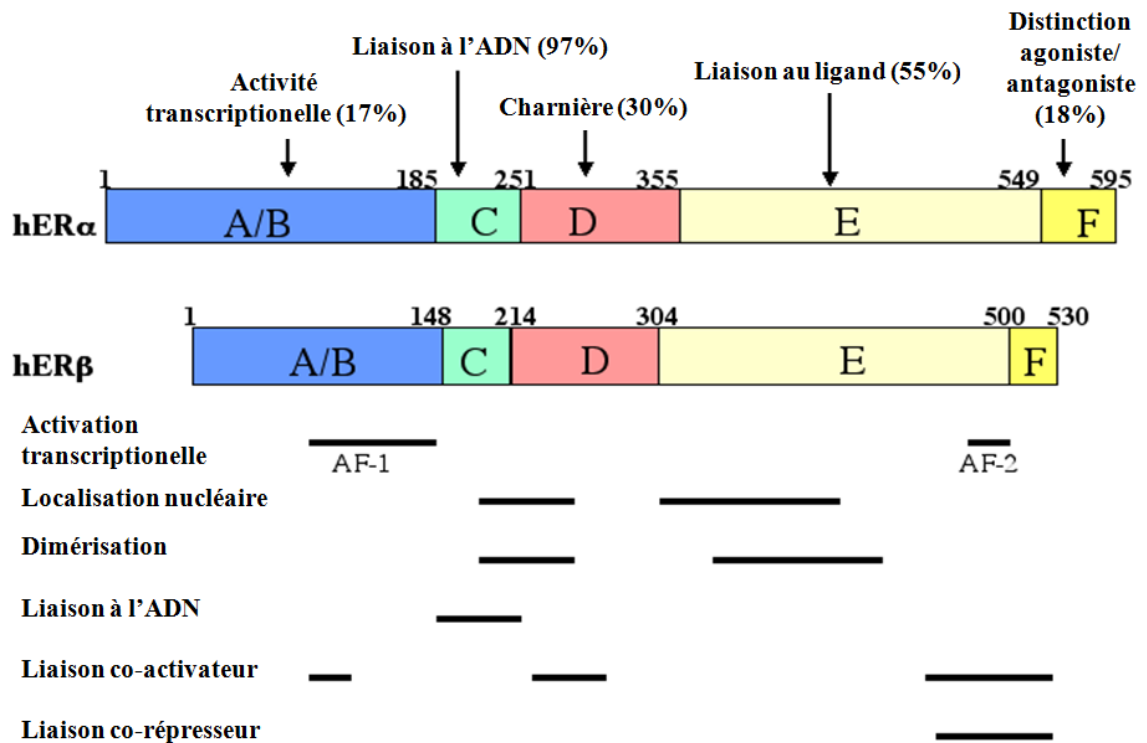


Figure 6. Représentation schématique de la structure commune des domaines fonctionnels des récepteurs estrogéniques RE- α et RE- β humains. La structure des RE est composée de trois différents domaines, soit le domaine NH₂-terminal ou A/B, le domaine de liaison à l'ADN ou C et le domaine de liaison du ligand ou D/E/F. Les régions responsables de l'activation transcriptionnelle AF-1 et AF-2, de la translocation nucléaire, de la dimérisation, de la liaison à l'ADN et de la liaison aux co-activateurs et co-répresseurs sont indiquées d'un trait. Les pourcentages représentent le rapport d'homologie entre les deux récepteurs. Image traduite et modifiée de [119].

Le domaine NH₂-terminal ou A/B encode la fonction AF1 (*Activation function 1*) qui active la transcription. Ce domaine est aussi impliqué au niveau d'interactions protéine-protéine et possède plusieurs sites de phosphorylation fonctionnels. Il participe, par le

recrutement de cofacteurs transcriptionnels, à l'activation et l'expression des gènes cibles de l'estradiol.[119] L'activité de l'AF1, plus présente dans le récepteur RE- α que RE- β , nécessite la transactivation de la fonction AF2 (*Activation function 2*). [118] Le DBD correspondant à la région C est presque parfaitement conservé entre les deux récepteurs. Cette région contient une structure à deux doigts de zinc jouant un rôle important dans la dimérisation des récepteurs et dans leur liaison aux séquences d'ADN spécifiques. Le domaine LBD correspondant à D/E/F permet la liaison des ligands, la dimérisation des récepteurs, la translocation nucléaire et la transactivation de l'expression de gènes cibles. Le LBD contient également l'AF2, dont la structure et la fonction sont dirigées par la liaison de ligands. [118] Le LBD est formé plus spécifiquement de la région charnière (domaine D) et de la région C-terminale (domaine E et F). La région D est une charnière flexible faiblement conservée permettant la liaison entre le domaine C et les domaines E et F contribuant à la spécificité et à la polarité de la fixation du récepteur à l'ADN. La région C-terminale principalement constituée du domaine E, forme le site de transactivation de l'AF2. [119] Le domaine F joue un rôle important dans la distinction des agonistes et des antagonistes des estrogènes par son interaction avec des facteurs cellulaires spécifiques.

1.3.2.2 Localisation cellulaire

Les récepteurs estrogéniques RE- α et RE- β sont localisés dans le cytoplasme et à la membrane cellulaire et nucléaire dans leur état inactif. [113] Autant chez la femme que chez l'homme, les RE sont retrouvés à différents degrés d'expression dans un grand nombre de tissus en plus des appareils reproducteurs, incluant le foie, le cerveau, les reins, les poumons, la moelle osseuse, les os et la muqueuse intestinale. [120, 121] La distribution de chacun des récepteurs diffère selon le type cellulaire. RE- β est plus particulièrement contenu dans les cellules de la granulosa de l'ovaire en plus des spermatides en développement des testicules. Les cellules stromales des ovaires et de l'endomètre de l'utérus expriment, quant à elles, plus fortement le récepteur RE- α . Cette distribution inégale suppose que les RE exercent des fonctions distinctes dépendamment du tissu dans lequel ils sont exprimés. De plus, les deux types de RE sont également présents dans le

système cardiovasculaire où ils sont exprimés par les cellules vasculaires telles que les CE, les CMLV et les cardiomyocytes. [122, 123]

1.3.2.3 Activation et signalisation cellulaire

La réponse cellulaire à l'E2 peut être engendrée par plusieurs modes d'activation de leur récepteur RE- α et RE- β . La réponse génomique dépendante du ligand est caractérisée par un changement dans la transcription des gènes. Une réponse cellulaire très rapide est provoquée lorsque la voie non génomique est enclenchée. La voie alternative indépendante du ligand, quant à elle, peut déclencher une réponse génomique ou non génomique. Ces différentes voies de signalisation sont décrites plus en détail dans la section suivante.

1.3.2.3.1 Voie génomique classique dépendante du ligand

Les hormones stéroïdiennes peuvent lier leurs récepteurs à la surface des membranes cellulaires cytoplasmique, mais possèdent également la capacité de diffuser à travers ces membranes afin de lier leurs récepteurs situés dans le cytoplasme ou aux membranes nucléaires. Les récepteurs RE sont maintenus inactifs par des protéines chaperonnes, généralement un complexe de protéines HSP (*heat-shock protein*), qui stabilisent les récepteurs et masquent leur domaine de liaison à l'ADN. Une fois l'E2 passé à travers la membrane, elle se lie aux domaines LBD des RE et les dissocient de leurs protéines chaperonnes. Le complexe formé du ligand et de son récepteur diffuse dans le noyau cellulaire pour se dimériser en homodimère ou hétérodimère puis se lier via leur domaine DBD à des séquences spécifiques d'ADN dites les éléments de réponse à l'estrogène (EREs, *estrogen-response elements*) localisés sur le promoteur du gène ciblé. [113] Le mécanisme de translocation nucléaire n'est pas encore entièrement connu, mais il semble que la protéine cytosolique calvéoline-1 stimule ce processus par une interaction directe avec le récepteur. [124] Le complexe estrogène-récepteur s'associe également à d'autres protéines telles les co-activateurs et les intégrateurs de transcription et peut supprimer la transcription de certains gènes cibles par leur interaction avec les co-répresseurs. [122]

1.3.2.3.2 Voie alternative indépendante du ligand

En absence d'E2, d'autres signaux cellulaires peuvent moduler l'activité des RE. [118] Comme la plupart des récepteurs nucléaires sont des phosphoprotéines, leur fonction peut être altérée lors d'un changement de leur état de phosphorylation en absence d'un ligand. [125] Les activateurs de protéines kinases, tels que les facteurs de croissance, peuvent induire la phosphorylation des récepteurs à un site qui diffère de celui de son ligand et ainsi éliciter une réponse indépendante de l'E2. Plus spécifiquement, les résidus sérine et tyrosine du domaine AF-1 sont phosphorylés soit via l'activation du récepteur à activité tyrosine kinase ou bien via l'action des MAPK. [126]

1.3.2.3.3 Voie non génomique dépendante du ligand

En plus des actions dites génomiques qui requièrent quelques heures, les estrogènes peuvent aussi produire des effets rapides variant de secondes à quelques minutes, où l'activation transcriptionnelle de gène n'est pas requise. Depuis plusieurs années, cette voie non nucléaire suscite l'intérêt de chercheurs tentant d'élucider son mécanisme. Cette voie de signalisation est d'ailleurs observée dans le système cardiovasculaire où la liaison de l'E2 à une forme de récepteur RE membranaire mène à une rapide activation de la eNOS, augmentant par le fait même, la production de NO et la vasodilatation. [127] Cet effet non génomique est dû à des récepteurs situés à la surface cellulaire et couplés à des protéines de transduction de signaux intracellulaires, particulièrement les protéines G. [128] La découverte d'un autre récepteur, le GPER1 ou GPR30, a permis de mieux comprendre cette voie d'activation. Le GPER1 est un RE intracellulaire et transmembranaire qui peut aussi initier la signalisation rapide non génomique via l'activation de la PI3K et des MAPK une fois lié à l'E2. [129] La voie non génomique permet alors une réponse cellulaire rapide en présence d'E2 telles que la sécrétion de NO, la régulation de la prolifération cellulaire et l'apoptose.[130] Cette action extranucléaire rapide est également utilisée par d'autres hormones stéroïdiennes incluant la progestérone et l'aldostérone.[131]

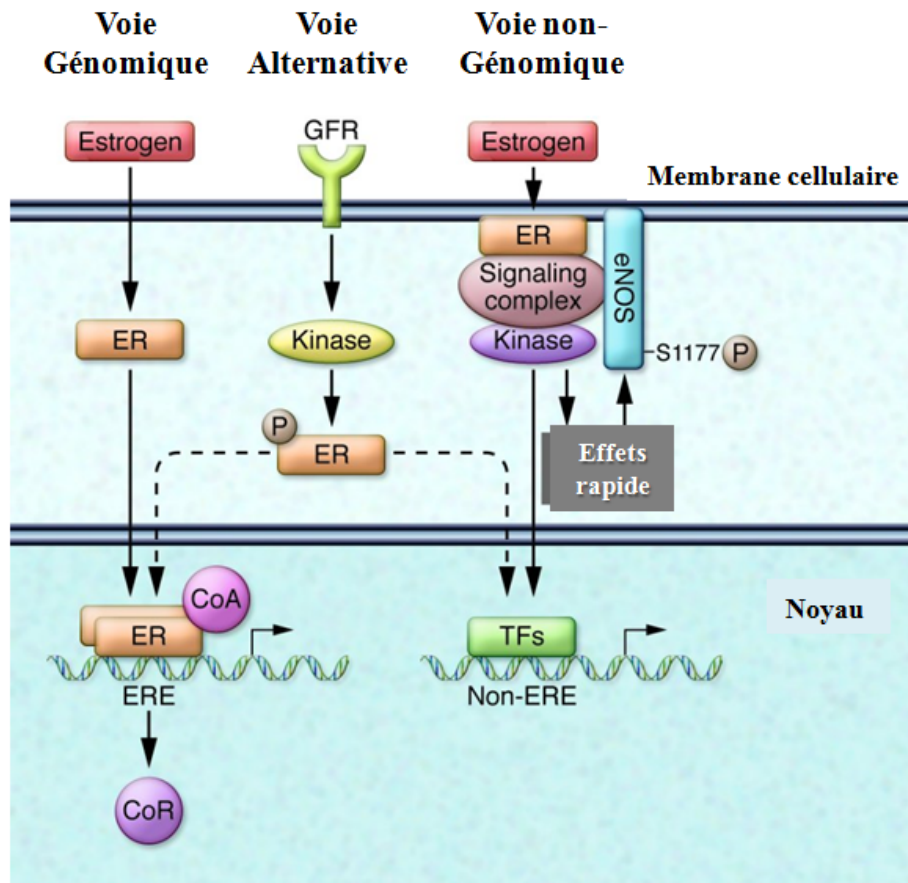


Figure 7. Mécanismes d'activation et de signalisation de l'E2 dans les cellules vasculaires. Les RE peuvent engendrer une réponse cellulaire par différentes voies de signalisation, soit la voie classique dite génomique, la voie non-génomique et la voie alternative indépendante du ligand. Cette dernière peut initier l'activation de la voie génomique par la phosphorylation des RE. Image traduite de [132] ER - estrogen receptor; ERE - *estrogen element response*; GFR - *growth factor receptor*; TF - *transcription factor*; CoA - co-activateur; CoR - co-répresseur.

1.3.2 Les mécanismes de protection vasculaire de l'estrogène

L'E2, présente à forte concentration chez les femmes pré-ménopausées, prévient le développement de MCV. En effet, grâce aux actions protectrices de l'E2, les femmes développent des maladies coronariennes en moyenne 10 ans plus tard que les hommes.

Plusieurs études mécanistiques ont démontré un effet vasoprotecteur et anti-inflammatoire autant de la forme naturelle que synthétique de cette hormone féminine. [133] Cette section décrit les principales activités de l'E2 au niveau cardiovasculaire.

1.3.2.1 Le profil lipidique

L'obésité et l'hypercholestérolémie, tel que mentionné précédemment, sont des facteurs de risque fortement impliqués dans le développement de MCV. L'augmentation des LDL et la diminution des HDL alors observées favorisent la formation de plaques lipidiques dans les vaisseaux et le développement de l'athérosclérose. Un des principaux mécanismes de l'E2 dans la protection vasculaire consiste à l'amélioration du profil lipidique. L'E2 via ses récepteurs réduit l'expression hépatique de gènes codant pour certaines apoprotéines (apolipoprotéines A, B, D, E et Lp(a)). [122] Plusieurs études ont démontré que la thérapie de remplacement hormonale (TRH) estrogénique chez les femmes post-ménopausées diminuait le cholestérol total, entre autres, en réduisant la concentration de LDL tout en augmentant la concentration de HDL et de triglycérides. L'E2 diminue également la concentration de lipoprotéines Lp(a) impliquées dans le recrutement de cellules inflammatoires. [134]

De plus, l'E2 possède des propriétés anti-oxydantes permettant de réduire l'oxydation des LDL impliqués dans la formation de cellules spumeuses et de la plaque athérosclérotique.[135] Cet effet protecteur de l'hormone serait dû à une diminution de la production d'anions superoxydes permettant d'augmenter la biodisponibilité du NO. [136]

1.3.2.2 Les cellules vasculaires et la réendothélialisation

L'E2 démontre des effets variés sur les cellules vasculaires. Tout d'abord, elle inhibe l'effet mitogénique d'un grand nombre de facteurs de croissance tels le FGF-2 et l'EGF sur les CMLV *in vitro* ce qui contribue à réduire leur prolifération et leur implication dans la formation du cap fibreux. [137] De plus, une étude *in vitro* démontre qu'une incubation des CMLV avec l'E2 augmente la sécrétion de TGF- β , un facteur anti-inflammatoire qui contrôle la prolifération et la différenciation cellulaire. Cette hausse de

TGF- β par l'E2 serait potentiellement impliquée dans l'inhibition de la prolifération des CMLV et de l'hyperplasie de l'intima.[138] Notre laboratoire s'est penché sur le rôle de l'E2 dans le maintien de l'intégrité vasculaire. *In vitro*, l'E2 bloque la prolifération et la migration des CMLV via l'inhibition des kinases ERK1/2 et p38 MAPK dépendante de RE- β tout en favorisant la migration et la prolifération des CE via l'activation du RE- α . [139, 140] Ces effets soulignent l'importance de l'E2 dans le remodelage vasculaire.

Des études *in vivo* menées par notre laboratoire ont exploré les effets bénéfiques de l'E2 sur la paroi vasculaire suite à une blessure vasculaire chez le porc. Lorsqu'une artère est atteinte d'athérosclérose, elle peut être dilatée par la pose d'une endoprothèse vasculaire permettant d'agrandir la lumière des vaisseaux, d'améliorer le flux sanguin et d'éviter des complications sévères telle la thrombose. Cependant, cette procédure cause une blessure à l'endothélium qui représente un risque de resténose, c'est-à-dire un rétrécissement de l'artère dû à la prolifération excessive des cellules vasculaires de la néointima. Lorsque l'E2 est ajoutée localement suite à une angioplastie ou précédant l'apposition d'une endoprothèse vasculaire, nos observations ont démontré une diminution de la néointima ainsi qu'une amélioration marquée de la réendothélisation favorisant une guérison vasculaire efficace et rapide. [141, 142]

Un autre mécanisme de guérison vasculaire modulé par l'E2 est la réendothélisation par les CEP. Comme mentionné précédemment, une diminution fonctionnelle de CEP est associée à un plus grand risque de développer des MCV. Ces cellules dérivées de la moelle osseuse et circulantes dans le sang sont recrutées au site de lésion et incorporées dans l'endothélium naissant de la paroi vasculaire dénudée où elles se différencient en CE matures. [143] La mobilisation des CEP favorise la réparation vasculaire en accélérant la réendothélisation et en réduisant la formation de néointima.[144] Dans une étude *in vivo* sur des souris ovariectomisées, une déficience en E2 diminue significativement le nombre de CEP circulant dans le sang, mais également résidant dans la moelle osseuse. Un traitement à l'E2 augmente la mobilisation et la prolifération des CEP via l'expression de la eNOS, accélérant ainsi la réendothélisation. [145, 146] Dans un modèle d'infarctus du myocarde,

l'E2 favorise la récupération par l'augmentation de la mobilisation et de l'incorporation des CEP au site d'ischémie via les récepteurs RE. [147, 148] Une étude effectuée par notre laboratoire suggère que le nombre et la maturation des CEP en CE change selon le sexe et les phases du cycle menstruel chez la femme. [149]

1.3.2.3 La régulation du monoxyde d'azote (NO)

Une autre fonction contribuant aux propriétés cardioprotectives de l'E2 est sa capacité d'augmenter la disponibilité du NO, un important vasodilatateur capable également de prévenir l'agrégation plaquettaire et de favoriser le remodelage et la perméabilité vasculaire. Comme mentionné dans la section 1.1.1.2, l'endothélium participe au maintien de l'homéostasie vasculaire par la production de médiateurs tels que le NO et la prostacycline de même que par des mécanismes régulant leur biodisponibilité. Le processus athérosclérotique contribue à une diminution de ces vasodilatateurs et à une induction de la vasoconstriction des vaisseaux. Cependant, l'E2 régule ce phénomène par l'augmentation de la biodisponibilité de NO, favorisant ainsi la vasodilatation des artères. La diminution de NO associée à l'âge et au stade de ménopause, peut être contrée par des traitements chroniques à l'E2 chez les femmes post-ménopausées permettant une augmentation de la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans les artères périphériques. [150] Différents mécanismes génomiques et non génomiques sont à l'origine de cet effet vasoprotecteur de l'E2. Tout d'abord, l'E2 est impliqué au niveau génomique par l'augmentation de l'expression protéique de la eNOS. Elle peut également induire l'activation de l'enzyme par sa voie rapide non génomique médiée par le récepteur RE- α et les voies signalétiques PI3K/Akt et MAPK. [151, 152]

Par ailleurs, la synthèse de NO vasculaire peut être catalysée par une autre isoforme majeure de NOS, la iNOS. Cette forme inductible de l'enzyme exprimée par les macrophages, les CMLV et les CE sous conditions oxydantes ou par certaines cytokines inflammatoires, est retrouvée uniquement dans les vaisseaux lésés. La iNOS, une fois activée, induit une accumulation importante de NO pouvant s'avérer toxique. Effectivement, à haute concentration, le NO interagit avec les ROS et ainsi produit de

puissants agents oxydants, les peroxy-nitrites, qui induisent une blessure vasculaire favorisant la formation de la néointima. Une étude a démontré que l'E2 inhibe l'expression de la iNOS de cellules aortiques de microglie et réduit l'accumulation de NO induite par une variété de stimuli inflammatoires. [153] De plus, l'E2 régule la disponibilité du NO en diminuant la production de superoxydes par l'inhibition de l'enzyme NAD(P)H oxydase, limitant la génération de peroxy-nitrites à partir du NO. [154] De ce fait, Wagner et al. proposent qu'un des effets anti-athérosclérotiques de l'E2 consiste à améliorer et normaliser la balance entre le NO et la formation de ROS des cellules vasculaires. [155]

1.3.2.4 Le processus inflammatoire

L'inflammation fait partie intégrante du processus d'athérogénèse. L'E2 de par son rôle immunomodulateur diminue la réponse vasculaire inflammatoire par l'altération de l'expression et de l'action de molécules d'adhésion et de chemokines des cellules vasculaires. En effet, l'expression par les CE des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine induites sous conditions inflammatoires est atténuée suite à un traitement d'E2. [156] Cette dernière permet ainsi de réduire le recrutement à l'endothélium de cellules inflammatoires. D'ailleurs, une étude utilisant des HAEC et des cellules de lignées monocytaires THP-1 confirme que l'E2 diminue significativement l'adhésion des monocytes aux CE. [157] Par ailleurs, la sécrétion par les CE de MCP-1, une chemokine impliquée dans la chemotaxie des leucocytes, ainsi que l'expression de son récepteur CCR2 par les monocytes, sont également diminués sous l'action de l'E2 [158, 159] et ce, via la voie non génomique de RE- α . [160] Dans cette ligne d'investigation, une étude provenant de notre laboratoire a aussi démontré que l'E2 prévenait l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium en réduisant, via le récepteur RE- α , l'expression de CD40 et de son ligand CD40L par les CE induite par l'IFN- γ . [161]

La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires est également modulée par les différents mécanismes d'action de l'E2. En effet, elle diminue la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8, et TNF par les CE tandis qu'elle induit la sécrétion d'IL-4, IL-10, et TGF- β , des cytokines anti-inflammatoires. [156] En

outre, plusieurs études ont démontré que l'E2 régule négativement l'activation du facteur de transcription NF- κ B par son interaction avec les RE, ce facteur étant impliqué dans le contrôle de l'expression des molécules d'adhésion, la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et l'activité de la CRP. [156]

Il est connu que l'E2 possède la capacité d'affecter le taux plasmatique de CRP, un important marqueur d'inflammation participant à tous les stades de développement de l'athérosclérose. Des études cliniques ont démontré que la TRH d'estrogène conjuguée par voie orale chez des femmes post-ménopausées provoquait une hausse substantielle de CRP. Par contre, cet effet n'étant pas observé par la voie transdermique, l'induction de CRP plasmatique par l'E2 absorbée oralement est principalement due à son effet sur le métabolisme hépatique. [162] De plus, l'augmentation de CRP observée dans certaines études randomisées n'était pas accompagnée d'une hausse d'IL-6, le régulateur majeur de la CRP en condition inflammatoire, révélant un mécanisme différent de l'E2 lorsque l'hormone est absorbée oralement. [163] Basé sur de récentes observations, Wang et al. proposent l'hypothèse selon laquelle l'E2 atténue la réponse inflammatoire au niveau d'une lésion vasculaire par l'inhibition de l'expression ou de l'action de la CRP. En effet, suite à une blessure du vaisseau, l'E2 réduit la formation de la néointima ainsi que l'expression locale de CRP chez des souris CRP^{tg} et ce, sans modifier la concentration plasmatique de CRP. [164] L'E2 pourrait donc représenter une stratégie thérapeutique importante dans l'inhibition de la CRP et de ses mécanismes inflammatoires au niveau des cellules vasculaires.

1.4 Problématique et but du projet de recherche

Nous savons aujourd'hui que la dysfonction endothéliale menant à la formation de plaque athérosclérotique est lié à la présence de facteurs de risque qui jouent un rôle prédominant dans ce phénomène. Au cours des dernières années, plusieurs études ont confirmé qu'en plus d'être un marqueur inflammatoire et un facteur de risque important, la CRP participe également au processus d'athérogénèse. D'ailleurs, son activité inflammatoire aux sites de lésion a été démontrée à maintes reprises et des équipes de recherche tentent maintenant de déterminer ses mécanismes d'action et les voies de signalisation impliquées.

Cependant, malgré les nombreuses études en cours, très peu se consacrent à l'élaboration de stratégies thérapeutiques possibles pouvant contribuer à diminuer le taux de CRP au site athérosclérotique et contrer ses activités pro-inflammatoires. Une étude récente a cependant établi un premier lien intéressant entre les effets cardioprotecteurs de l'E2 et l'atténuation de l'activité pro-inflammatoire de la CRP sur la formation de la néointima. [164] Face à la compréhension du rôle prépondérant de cette protéine plasmatique dans l'athérosclérose et des propriétés anti-inflammatoires et vasoprotectrices de l'E2, l'action bénéfique potentielle des estrogènes sur l'inhibition des mécanismes de la CRP pourrait apporter des développements majeurs pour la prévention contre l'athérosclérose.

Mon projet de maîtrise avait donc comme but principal de déterminer la capacité de l'E2 à inhiber l'activation inflammatoire des CE vasculaires induite par la CRP. Plus précisément, nous voulions évaluer la possibilité que *l'E2 puisse bloquer ou réduire l'induction de l'expression de molécules pro-inflammatoires modulée par la CRP et ce, en interférant directement sur la production endogène de CRP par les CE et/ou ses mécanismes d'activation.*

Afin de répondre à cette hypothèse, nous avons développé des objectifs précis. Premièrement, comme la concentration locale de CRP augmente rapidement au niveau des lésions athérosclérotiques, nous voulions évaluer (1) l'habileté de l'E2 à réduire et même

bloquer l'auto-induction de la CRP dans les CE. Par la suite, ses mécanismes d'action étant multiples sur les CE vasculaires, (2) la réduction de l'expression de molécules pro-inflammatoires induites par la CRP est évaluée suite à un traitement de ces cellules à l'E2. Toujours dans le but d'identifier des mécanismes d'action possible, nous nous sommes intéressés à la modulation négative de la capacité migratoire des CE par la CRP énoncée récemment par une équipe de recherche. En effet, ces derniers démontrent qu'une exposition chronique à la CRP inhibe la migration des CE induite par le VEGF, illustrant sa contribution au ralentissement de la réendothélisation. [165] Nous savons que l'E2 induit l'angiogenèse en partie par l'expression de VEGF et favorise entre autres, la migration des CE vasculaires afin de former de nouveaux vaisseaux sanguins.[166-168] À la lumière de ces connaissances, nous avons évalué (3) la possibilité que l'E2 puisse contrer l'effet de la CRP sur la migration des CE induite par le VEGF et améliorer leur capacité migratoire. Les mécanismes impliqués dans cet effet ont aussi été examinés.

Cette étude mettra en évidence, tout d'abord, la capacité des CE vasculaires humaines à auto-induire l'expression protéique de la CRP contribuant à l'augmentation rapide de sa concentration, mais également la réduction de cette auto-induction par l'E2. De plus, l'atténuation des mécanismes d'action pro-inflammatoires de la CRP permettra de mener à une application future de l'E2 dans la réduction de l'activation inflammatoire et la stabilisation de la plaque athérosclérotique. Finalement, ces résultats permettront de souligner une nouvelle approche à travers laquelle l'E2 pourrait favoriser la réparation vasculaire et contribuer à l'amélioration de la réendothélisation par la régulation négative d'une importante voie pro-athérogénique inflammatoire.

2. Article scientifique

2.1.1 Estradiol inhibits vascular endothelial cells pro-inflammatory activation induced by C-reactive protein

Émilie Cossette^{1,2,3}, Isabelle Cloutier¹, Jean-François Tanguay^{1,2,3},

¹Research Center, Montreal Heart Institute; ²Biomedical science department, ³Faculty of medicine, Université de Montréal, 2900 Blv. Édouard-Montpetit, Montréal (Qc.), H3T 1J4, Canada.

Contribution of the authors:

Émilie Cossette: conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing.

Isabelle Cloutier: conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing and review.

Jean-François Tanguay: conception and design, final approval of manuscript.

Corresponding author: Dr Jean-François Tanguay

2.1.1.1 Abstract

In addition of being an important inflammatory biomarker and a risk factor for cardiovascular disease, many evidence indicate that the C-reactive protein (CRP) contributes to the atherosclerosis development process. Indeed, this plasmatic protein synthesized by hepatocytes in response to inflammation and tissue injury induces pro-inflammatory molecules expression by endothelial cells (EC). Previous studies showed that 17 β -estradiol (E2) has beneficial effects on vascular cells by reducing *in vitro* pro-inflammatory molecules expression in EC. Therefore, we hypothesize that E2 blocks or reduces CRP-mediated inflammatory responses by modulating endogenous production of CRP in EC and/or activation mechanism. By using human aortic endothelial cells (HAEC), we first confirmed CRP production by vascular EC and secondly demonstrated its self-induction. Indeed, recombinant human CRP (rhCRP) stimulation induces a fivefold increase of CRP expression. A 1 h pretreatment of E2 at a physiologic dose (10^{-9} M) leads to an important decrease of this protein production suggesting a partial blockage of the CRP amplification loop mechanism. Furthermore, in HAEC, E2 reduces the secretion of the most potent agonist of CRP induction, IL-6, by 21%. E2 pretreatment decreased the pro-inflammatory molecules IL-8, VCAM-1 and ICAM-1 induced by CRP and implicated in monocytes recruitment. In addition, we demonstrated that E2 could restore VEGF-mediated EC migration response impaired by CRP suggesting another pro-angiogenic property of this hormone. These findings suggest that E2 can interfere with CRP pro-inflammatory effects via activation signals using its rapid non genomic pathway that may provide a new mechanism to improve vascular repair.

Keywords: Protein C-Reactive, Estradiol, Atherosclerosis, Inflammation, Endothelial cells

2.1.1.2 Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is currently the most important cause of death in developed countries. Atherosclerosis, the underlying cause of most CVD, is a dynamic and progressive inflammatory disease characterized by lipid plaque formation within the arterial wall and luminal reduction. Indeed, accumulating data suggest that inflammatory process plays a central role in the initiation, progression and the final steps of this pathology as vulnerable plaque rupture. [1, 2] Many risk factors have been associated with the development of atherosclerosis such as age, hypercholesterolemia, male sex, diabetes, obesity and hypertension. [3-6] Since atherosclerosis represents a process of chronic vascular inflammation, investigation has confirmed inflammatory biomarkers as new risk factors. Indeed, various plasmatic inflammatory markers are now considered to identify patients with higher risk of future CVD. [7] However, C-reactive protein (CRP) has emerged as the most powerful predictor and is the most extensively studied systemic marker of inflammation. [8] In fact, among other systemic inflammatory mediators, CRP has been widely accepted as a strong and independent risk factor predicting CVD. [9] As so, elevated baseline concentration of high sensitivity CRP (hsCRP) correlates with the risk of future atherosclerotic events. [10, 11]

CRP, composed of five identical associated and nonglycosylated 23-kDa subunits, is an acute phase reactant induced during inflammation reaching up to 100- to 1000-fold its baseline plasma concentration in 24-72h. [12] Synthesized mainly in the liver by hepatocytes in response to inflammation and tissue injury, it was recently demonstrated that CRP can be secreted by other cell types such as smooth muscle cells (SMC), macrophages and endothelial cells (EC). [13-15] CRP is also detected in atherosclerotic lesions and coronary artery walls. [16] Initially considered as an inflammatory biomarker of CVD, evidence now suggests that CRP may also participate in all processes of atherogenesis, from endothelial dysfunction to plaque rupture. [17] Indeed, CRP has been implicated in reducing mediators of vasodilatation such as nitric oxide (NO) [18], inducing expression of pro-inflammatory molecules by EC [19, 20] and promoting recruitment of leucocytes to

vascular lesions [21]. CRP may contribute to lipid content in plaque formation by aggregating low density-lipoprotein (LDL) molecules which upon excessive uptake by macrophages will favour foam cell development. [22] CRP promotes vascular SMC proliferation and migration [23] while slowing down the reendothelialization process by reducing the VEGF mediated migratory response of EC after vascular injury. [24] Therefore, CRP may be an important therapeutic target for the prevention and treatment of atherosclerosis.

Women develop coronary heart diseases (CHD) on average 10 years later than men. This has been attributed, at least in part, to the protective effects of female sex hormones, particularly estrogens (E2). [25, 26] In fact, this effect is lost after menopause when the concentration of 17 β -estradiol (E2) is reduced drastically. [27] Several studies have shown that E2 has vasoprotective effects and can modulate inflammatory responses. [26, 28] One of its action mechanisms in cardiovascular protection consists in improving lipid profile by increasing HDL-cholesterol while lowering LDL-cholesterol. [29] E2 also promotes arterial vasorelaxation and inhibits platelet aggregation by regulating NO bioavailability. [30] Another important role in vasoprotection is to accelerate reendothelialization and repair after vascular injury. We have shown that intravascular delivery of E2 prior to stent implantation improves vascular healing with accelerated reendothelialization and inhibition of the inflammatory response, reducing in-stent restenosis. [31, 32] E2 also regulates a variety of anti-inflammatory properties such as reducing vascular expression of chemokines, cytokines and adhesion molecules therefore decreasing leukocyte recruitment and accumulation into the vascular wall. [33, 34]

However, despite the possible role of CRP in atherogenesis, little is dedicated to the investigation of possible therapeutic strategies to reduce its concentration in the atherosclerotic site. In this study, we hypothesized that E2 blocks or reduces CRP-mediated inflammatory response by modulating endogenous production of CRP in EC and/or activation mechanisms. By our observations, E2 pre-treatment decreases the CRP auto-induction as well as IL-6 and IL-8 cytokines secretion, key players in the inflammatory process. E2 pretreatment reduced expression of adhesion molecules, VCAM-1 and ICAM-

1, induced by CRP. In addition, we assessed the ability of E2 to counteract impairment of EC migration by CRP. Indeed, E2 partially restored VEGF-promoted migration of CRP-treated EC. Therefore, we propose that E2 modulates the vascular EC pro-inflammatory activation induced by CRP. Taken together, these results underline a new approach through which E2 could improve vascular repair while negatively regulating the important pro-atherogenic inflammatory pathway regulated by CRP.

2.1.1.3 Material and methods

2.1.1.3.1 Reagents

Recombinant human CRP (rhCRP) (Lee Biosolutions, St-Louis, MN, USA) was initially dialyzed for 24 hours using a dialysis slide (Fisher Scientific, Ottawa, CAN) with a cutoff of 10 KDa to remove sodium azide present in commercial CRP preparations. In a second step, the CRP was purified using a Detoxigel column (Fisher Scientific) to remove contaminating lipopolysaccharide (LPS) and absence of endotoxin was confirmed with a limulus amebocyte lysate (LAL) test (LONZA, Walkersville, MD). Water soluble beta-estradiol-and lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* 0111:B4 were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit OptEIA for measurement of IL-6 and IL-8 are from BD Biosciences (Mississauga, ON, CA). NG-Nitro-L-arginine-methyl ester.hydrochloride (L-NAME.HCL) was purchased from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA). P38/RK MAP Kinase inhibitor SB203580 and the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) inhibitor U0126 were obtained from InvivoGen (San Diego, California, USA). Recombinant human VEGF₁₆₅ and human VEGF ELISA development kit were provided by Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA) while (S)-Nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) was from Tocris Bioscience (Ellisville, Missouri, USA). Monoclonal anti-human/mouse/porcine C-Reactive Protein (CRP) antibody, monoclonal anti-human VEGFR2/KDR-Phycoerythrin and mouse IgG1 Phycoerythrin Isotype Control were purchased from R & D systems (Minneapolis, MN, USA). The anti-actin (I-19) antibody, goat anti-mouse IgG HRP and donkey anti-goat IgG-HRP were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

2.1.1.3.2 Cells culture

Human aortic endothelial cell (HAEC) were purchased from LONZA and used in experiments at passage 4 to 6. Cells were cultured with EGM-2MV BulletKit (LONZA) supplemented with 5% FBS, 0,6% HEPES and maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. All FBS used was pre-treated with 1% charcoal to eliminate endogenous

estrogens. For this, charcoal was added to FBS, gently mixed for 1 h at room temperature before filtration on a 0,22µm filter and storage at 4°C. HAEC were plated in 6-well plates (Costar, Corning, NY, USA) at $1,05 \times 10^4$ cells/cm² and cultured to 80-90% confluence before being starved in EGM-2MV, 0,1% FBS for 18 h. HAEC were then incubated with different treatments.

2.1.1.3.3 Analysis of protein expression by Western blot

To evaluate the self-induction of CRP and adhesion molecules (VCAM-1 and ICAM-1) protein expression, HAECs were first treated with rhCRP at different doses (1; 2,5; 5; 10 and 25 ug/ml) for 24 h. To evaluate the impact of estrogen on these inductions, cells were pretreated with E2 (10^{-8} or 10^{-9} M) for 1 h before being exposed to rhCRP at 25ug/ml for 24 h. Single treatments were used as reference controls. After the incubation period, cell were lyzed using lysis buffer [20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1,2% Triton X-100, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 15,1 ul/ml aprotinine, 10 ug/ml leupeptine, 1 mM NaVo3]. Total protein extract was quantified by Bradford technique (Bio-Rad). Equivalent amount of protein (20 ug) was electrophorized on a 15% sodium dodecyl sulphate gel (SDS-PAGE). rhCRP (5 ng) was added to SDS-PAGE as positive control. Proteins were transblotted to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane that was soaked in 5% nonfat dry milk prepared in TBS-T [Tris-buffered saline (63 mM Tris-HCl, 7,3 mM NaCl) containing 0,1% Tween 20] for 1 h at room temperature to block nonspecific binding. Membranes were then incubated overnight with one of the following primary antibodies: anti-CRP (1/500), anti-actin I19 (1/1000), anti-VCAM-1(1/1000) and anti-ICAM-1 (1/2000) antibodies. Membranes were washed three times in TBS-T at room temperature and incubated with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (1/10 000) or donkey anti-goat IgG (1/20 000) or donkey anti-rabbit IgG (1/10 000) for 1 h at room temperature. The blots were washed three times with TBS-T and antigen detection was performed with Immun-Star Western C kit (Bio-Rad). The intensity of bands was analysis with Quantity One program. Results are expressed in ratio over actin.

2.1.1.3.4 ELISA assay for IL-6, IL-8 and VEGF

Cytokines secretion by HAEC was evaluated after stimulation with rhCRP at 25 ug/ml for 24 h with or without a pretreatment with E2 (10^{-8} or 10^{-9} M) for 1 h. After the incubation period, supernatants were harvested and centrifuged to remove cells. IL-6, IL-8 and VEGF concentrations in culture media were measured using commercially available ELISA kits. All procedures were performed according to the manufacturer's instructions. All samples were assessed in triplicate.

2.1.1.3.5 Migration assay of HAEC

HAEC migration mediated by VEGF was assessed in Transwell cell-culture 96 well plates (Corning) equipped with a gelatine-coated polycarbonate membrane with 5 μ M pores. Before the assay, cells were pretreated in 6-well plates with E2 (10^{-8} or 10^{-9} M) for 1 h, stimulated with rhCRP at 25 ug/ml for 24 h or each treatment alone. L-NAME (10^{-4} M) was added for 30 min before treatment of E2 and stimulation of rhCRP or the combination of both. Cells were harvested with trypsin-0,05% EDTA for 2 min, resuspended in EGM-2MV, 1% FBS and 5×10^4 cells were added in the upper chamber of the Transwell plate and were migrated for 4h. EGM-2MV, 1% FBS alone or with VEGF (20 ng/ml) was added to the lower chamber as chemoattractant. For inhibitors study, L-NAME (10^{-4} M) was added to both the upper and lower compartment and was present throughout the experiment. After 4 h incubation at 37°C in the presence of 5% CO₂, the cells were fixed in methanol, stained with hematoxylin-eosin dye and the top side of the insert membrane was scrubbed free of cells with a cotton swab. Membranes were removed with a scalpel and mounted on microscope slides with migrated cell face up. Three evenly spaced fields on each membrane were chosen and pictures were taken with an inverse light microscope (CKX41 of Olympus) equipped with a camera (QIMAGING, QICAM, Olympus) to obtain a computer-digitized image. Migrated cell counts were performed by one person blinded to treatment using ImagePro 6.2 software.

2.1.1.3.6 VEGFR-2 expression on HAEC by flow cytometer

HAEC were pretreated with E2 (10^{-8} or 10^{-9} M) for 1 h, stimulated with rhCRP at 25 ug/ml for 24 h or each treatment alone to evaluate VEGFR-2 expression at the cell surface. Harvested cells were resuspended in PBS-0,5% BSA and non specific binding sites were blocked with 5% of normal mouse serum for 20 min. HAEC were incubated with monoclonal anti-human VEGFR2/KDR-Phycoerythrin (PE, 5 ug/ml) or mouse IgG1 PE isotype control (2,5 ug/ml) for 20 min. Cells were then washed with PBS-0,5% BSA to remove unreacted anti-VEGF R2 reagent and were resuspended in cytometer buffer. System II software for XL/XLMCL flow cytometer was used for acquisition on an Epics XL coulter cytometer. For each sample, 10 000 cells were analyzed using the program Weasel. Data were expressed as mean fluorescence intensities (MFI) after background subtraction from the corresponding IgG control.

2.1.1.3.7 Statistical analysis

All data were presented as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) for multiple testing followed by Dunnett for ELISA, western blot, adhesion molecules analysis (VCAM-1 and ICAM-1) and EC migration assay and by Tukey-Kramer multiple comparisons post test for all others experiments. All statistics were performed using the GraphPad InStat software. Probability values were considered significant at $p < 0.05$.

2.1.1.4 Results

2.1.1.4.1 Auto-induction of CRP production by HAECs

To evaluate self-induced CRP protein expression in vascular EC, rhCRP was added to HAECs at different doses (1; 2,5; 5; 10 and 25ug/ml) for 24 h and cell lysates were analyzed by western blot. Results of CRP expression were normalized on β -actin expression. There was no CRP protein detectable under basal condition. Incubation of HAECs with rhCRP enhanced, in a dose dependant manner, the CRP protein level (Fig.1). A fivefold increase in CRP self-induction was obtained with 25ug/ml of rhCRP, when compared to 10ug/ml. This increase was significant compared to all other rhCRP concentrations. The dose of 25ug/ml was selected to conduct further investigation.

2.1.1.4.2 E2 inhibits auto-induction of CRP by HAECs

To evaluate the capacity of E2 to reduce or block the CRP self-induction, cells were pretreated with a supraphysiologic and physiologic doses (10^{-8} and 10^{-9} M) of E2 for 1 h prior the rhCRP stimulation for 24 h. HAEC treated with E2 alone were still negative for CRP protein expression (Fig 2). When added in pretreatment before the CRP stimulation, E2 significantly inhibits in a dose-dependent manner the CRP self-induction with a 50% reduction at the physiologic dose of E2 (10^{-9} M) ($p < 0.01$).

2.1.1.4.3 E2 reduces CRP-induced pro-inflammatory cytokine response

As E2 pre-treatment reduces CRP expression, we have investigated by ELISA the impact of E2 on IL-6 secretion, one of the most potent agonist of CRP production. [12] In a dose response study with a 24 h stimulation, we first observed that a significant increase in IL-6 secretion could be obtained with the 25ug/ml of rhCRP only (Fig.3A). The rise of IL-6 release was increased two fold between the 10ug/mL CRP dose compared to the highest dose. E2 added as pre-treatment for 1 h at 10^{-9} M reduced by 21% the IL-6 secretion triggered by the 24 h rhCRP stimulation (Fig.3C).

We have extended our analysis to another cytokine, the IL-8 also an important player of the inflammatory process promoting leukocyte migration. A similar profile as for

IL-6 was observed with a significant increased in IL-8 secretion only with the 25ug/ml rhCRP stimulation (Fig.3B). E2 pre-treatment at 10^{-8} and 10^{-9} M for 1 h reduced significantly up to 21% the impact on CRP stimulation on IL-8 production (Fig.3D). E2 by itself at the tested doses had no significant effect on the basal level of IL-6 and IL-8 produced by the HAEC.

2.1.1.4.4 E2 reduces CRP-induced adhesion molecule upregulation

CRP is known to trigger adhesion molecule expression such as VCAM-1 and ICAM-1 [19], involved in inflammatory cells recruitment to endothelial lesion sites. After observing that E2 reduced the level of IL-8 secreted in response to CRP, a chemokine important for leukocyte recruitment and adhesion to the endothelium, we evaluated if E2 could also reduce EC adhesion molecule expression levels induced by rhCRP. By western blot analysis, we first evaluated adhesion molecules total protein expression in HAECs after stimulation with increasing doses of detoxified rhCRP. Enhanced levels of VCAM-1 and ICAM-1 proteins were observed only with the highest dose of rhCRP (25ug/ml) (Fig.4A and B). This induction was as efficient as the one obtained with 1ug/ml of *E. Coli* lipopolysaccharide (LPS) used for positive control. Afterward, we investigated VCAM-1 and ICAM-1 protein expression following E2 and rhCRP treatments either alone or in combination. E2 alone had no effect on the expression levels of both adhesion molecules. However, addition of E2 in pretreatment (10^{-8} and 10^{-9} M) prior the 24 h rhCRP stimulation decreased VCAM (fig 4C) and ICAM (fig 4D) protein levels significantly by 40% in the case of VCAM-1 using a physiologic dose of E2 (10^{-9} M) (Fig. 4C).

2.1.1.4.5 E2 restores HAECs migration reduced by CRP

It was previously demonstrated that chronic CRP exposure inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF)-induce migration of vascular EC [24]. In contrast, E2 has an important proangiogenic potential mediating EC proliferation and migration. [35] In fact, many studies have demonstrated that this hormone is highly involved in reendothelialization and vascular repair. [31, 36] As E2 modulates the pro-inflammatory

responses induced by rhCRP and favours an anti-inflammatory pattern, we explored if E2 could improve EC migration impaired by CRP. Using Transwell migration assay, we first demonstrated that cells stimulated with rhCRP at 25ug/ml (48.84 ± 4.96 %) for 24 h had a 51% reduction in their migratory capacity compared to basal condition (Fig.5, black bar vs. white bar). In contrast, cells exposed to E2 at 10^{-9} M (153.12 ± 9.77 %) for 1 h demonstrated a 49% increase in migratory activity when compared to cells in media alone (Fig.5, pale gray bar vs. white bar). When added in pre-treatment, E2 (10^{-9} M) blocks the inhibitory effect of the rhCRP stimulation and restores the basal HAECs migration response (113.90 ± 21.13 %) to VEGF (Fig.5, dark gray bar vs. dark bar vs. white bar).

Nitric oxide (NO) has been reported to be central to the E2-mediated migration and pro-angiogenic activity as well as in the angiogenic response to VEGF. To elucidate if NO is implicated in the mechanism of E2 to restore migration of CRP-treated EC, cells were treated with L-NAME, an inhibitor of NOS enzyme. L-NAME (10^{-4} M) treatment of 30 min was performed before exposure to E2 (70.94 ± 14.65 %) to confirm the implication of NO in E2-mediated pro-migratory effect toward VEGF. A significantly 58% reduction in HAEC migration was observed compared to E2 treatment alone (Fig 5, line bar vs. pale gray bar). However, after rhCRP stimulation, L-NAME did not prevent the positive effect of E2 on the VEGF-mediated migratory response of CRP-exposed HAEC (127.76 ± 25.03 %) (Fig.5, scared bar vs. dark gray bar). Therefore, these data suggest that NO is not the mechanism by which E2 modulates the inhibition effect of CRP on VEGF-mediated EC migration.

2.1.1.4.6 VEGF and VEGFR-2 in E2 mediated migration of CRP-treated EC

E2 proangiogenic potential is also related to induction of VEGF production by cells that could lead to increased expression of its receptor, VEGF receptor 2 (VEGFR-2). [37] CRP can reduce the expression of this important receptor of the angiogenic mechanism. [38] To evaluate the involvement of this growth factor and its receptor in E2 effect to restore EC migration altered by CRP, secretion of VEGF was measured in supernatants while VEGFR-2 expression at the cell surface was determined using HAECs treated with

E2 and rhCRP, alone or combined. However, in such experimental conditions, no significant modulation of this angiogenic system by either E2 or CRP was observed for both VEGF production and expression of its receptor (Fig. 6).

2.1.1.5 Discussion

It is well accepted that vascular inflammation plays a critical role in atherogenesis and development of endothelial activation and dysfunction. The inflammatory biomarker CRP has been shown in numerous prospective studies to predict cardiovascular events. [39-41] This protein is a pluripotent mediator of the inflammatory process central to atherosclerotic diseases. [17] Indeed, it was shown to be present in high concentration in lesion sites. [42] Moreover, Yasojima et al. were the first to demonstrate an endogenous extrahepatic CRP production by intimal vascular cell. [42] Activated EC can produce this protein in response to inflammation and multiple metabolic factors during the development of atherosclerosis. In fact, it was established that the most important agonist of CRP production in HAEC, the cytokine IL-6, is the same that regulates its transcriptional induction in the liver. [15] IL-6 may act alone or synergistically with IL-1 β . [43] Therefore, vascular EC have the ability to express CRP and thus contribute to the rapid increase of its local concentration in injured sites. Originally, this amplification of CRP production was attributable only to the liver with subsequent deposition of this protein in the inflammatory sites. Moreover, IL-6 is itself induced in response to inflammatory activity of this plasma protein. [44] Then, an amplification loop could occur with increasing production of this cytokine promoting additional CRP expression that would take place directly at the level of vascular EC. [43]

In the present study, purified rhCRP free of sodium azide and endotoxin, which can contaminate commercial CRP and induce artefacts [45], was used to evaluate its self-induction in vascular EC. A dose dependent increase in self-induced protein expression was observed following stimulation of HAEC with rhCRP. The most significant effect occurred with the highest CRP dose (25ug/ml) used. In fact, this concentration led to a five-fold increase of protein production and could be representative of the exponential rise caused by a positive feedback on its own expression. Stimulation from 10 to 25ug/ml represents a 2.5 times increase while CRP expression raised five-fold, suggesting that the latter could not be caused by the protein adhesion or uptake by cells only. An equivalent dose in plasma represents a very high risk of CVD. However, CRP mRNA concentration in the

atherosclerotic plaques being ten times higher than in a normal artery and seven times superior as in liver, [42] suggest that the rate observed in lesion sites may be much greater than in serum. Our observations are the first suggesting a CRP synthesis and secretion that could result from an endogenous autocrine/paracrine loop generated by EC. This potential positive feedback of CRP production by cells present in atherosclerotic lesions could lead to local increase concentration and contribute to its pro-inflammatory and proatherogenic effects. This self-induction represents an important target for the prevention of the inflammatory development of atherosclerosis.

E2 has different mechanisms of vascular protection that include modulation of inflammatory responses. In fact, this hormone reduces vascular inflammation by altering expression of adhesion molecules and chemokines in vascular cells, decreasing leucocytes migration to lesion site. E2 has a double-positive effect; reducing pro-inflammatory molecule expression such as IL-6, IL-8 and TNF- α while increasing anti-inflammatory molecules such as IL-4, IL-10 and TGF- β . [33] In addition, several studies demonstrated that E2 negatively regulates the activation of the transcription factor NF- κ B involved in controlling expression of adhesion molecules, secretion of pro-inflammatory cytokines and production of CRP by EC. [26, 33, 46, 47] The cardioprotective effects of E2, however, were questioned following the publication of various studies that have tested *in vivo* hormonal replacement therapy (HRT). [48, 49] While some results were controversial, an increase of hsCRP (*high sensitive* CRP) was even observed with the use of HRT in postmenopausal women. [50] Several factors may explain such conflicting results including drug composition (estrogen alone or combined with progesterone), concentration, treatment time and route of administration. A different effect of transdermal E2 compared to oral administration with increased plasmatic CRP level observed only in the latter case, suggesting a first passage effect in the liver. [51] In an animal study, E2 administered subcutaneously to transgenic mice expressing human CRP (CRPtg) abolished the overexpression of CRP in the intima following a ligation of the coronary artery. It also reduced vascular inflammation, despite a stable blood level of CRP. [52] Therefore, a targeted delivery of the hormone may play a distinct role and have a beneficial effect for

the prevention of atherosclerosis. Our results show that, effectively, a pretreatment of E2 for 1 h at doses equivalent to its supraphysiologic and physiological concentration (10^{-8} and 10^{-9} M) reduces the self-induction of CRP protein expression. These results reveal that E2 attenuate the CRP expression by a rapid effect. Indeed, E2 non genomic pathway is involved in the modulation of important vasoprotective activities including NO secretion, cell migration and proliferation. [53-55] The short term pretreatment used in our experiments reflect another beneficial effect mediated through this pathway.

As we demonstrated a reduction of CRP self-induction by E2, the effect of the pretreatment on IL-6 secretion, the principal agonist of CRP plasmatic production, was also evaluated in our study. We first confirmed the elevation of IL-6 production by EC with CRP treatment, where a significant response was obtained with the dose of 25ug/ml of rhCRP. Our results are consistent with those of Verma et al. which showed a similar elevation in IL-6 level following addition of CRP to human saphenous vein endothelial cells (HSVEC). [44] This important increase of IL-6 secretion could contribute to the exponential rise in CRP expression. Therefore, the down regulation of IL-6 could be another pathway by which E2 partially inhibits the positive feedback loop of CRP-induced in human EC. Thus, we were able to show that E2 reduces CRP self-induction and additionally, the production of IL-6, its major agonist.

One important step of atherosclerosis development is the recruitment of monocytes in the vascular wall where they are transformed into foam cells, contributing to the inflammatory response and to the atherosclerotic lesion. This stage of vascular disease is characterized by a rise of chemokines secretion by EC including IL-8 and MCP-1 that induce migration of inflammatory cells to lesion sites. Then, mononuclear cells adhere to endothelium expressing adhesion molecules such as ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin. [56] Besides, it is known that a substantial enhancement of CRP production in sites of atheromatous lesions is followed by increased expression of pro-inflammatory molecules by EC. [19, 20] These inflammatory responses triggered by the plasmatic protein result in recruitment of leucocytes to lesion sites. In fact, CRP can modulate mononuclear cells chemotaxis in part by increasing IL-8 release. [20] By our observations, we confirm an

important rise of this inflammatory cytokine secretion by HAEC following rhCRP stimulation. Furthermore, the plasmatic protein can also induce firm adhesion of monocytes to injured arterial wall by the regulation of VCAM-1 and ICAM-1 expression. This phenomenon was demonstrated by Devaraj et al. where CRP promoted monocytes adhesion to an HAEC monolayer under static and shear flow condition. [21] Several research teams, including Pasceri et al, reported that adhesion molecules expressions in EC were increased by CRP. [19] We confirm with rhCRP treatment the rise of ICAM-1 and VCAM-1 production by HAEC. The most potent increase of these adhesion molecules was observed with the same dose of rhCRP (25ug/ml) used to obtain significant induction of cytokines IL-6 and IL-8, suggesting important inflammatory activity triggered with this CRP concentration. However, such inflammatory profile observed during the formation of atherosclerosis can be modified by E2. This hormone can modulate vascular inflammatory responses by reducing chemokines and adhesion molecules expression thereby decreasing monocytes recruitment. Indeed, this hormone at 10^{-8} and 10^{-9} M was shown to inhibit leukocyte migration and adhesion by blocking IL-8 secretion in human umbilical vein EC (HUVEC). [57] Also, it was shown that E2 attenuated recruitment of monocytes to HAEC in response to TNF- α . [34] By using E2 pretreatment before rhCRP stimulation of HAEC, we observed a decreased IL-8 secretion and reduced VCAM-1 and ICAM-1 protein production by HAEC. Thus, in presence of TNF- α , E2 could reduce leukocyte recruitment induced by CRP *in vitro* by decreasing pro-inflammatory molecules expression by vascular EC.

Vascular repair is as important as the reduction of inflammation to prevent progression of atherogenesis process. To allow arterial injury healing, regeneration of a healthy endothelium is essential to restore control of vascular tone, homeostasis as well as anticoagulant, anti-aggregating and anti-inflammatory properties. [58] Reendothelialization and angiogenesis necessary for endothelium reconstitution require EC proliferation and migration. However, some evidences suggest that CRP may inhibit these cellular functions. Indeed, a significant attenuation of the reendothelialization process with decreased EC proliferation response was reported in a carotid artery injury model of transgenic mice

expressing rabbit CRP. [59] In accordance to these data, a very recent article demonstrated that long-term exposure to this plasmatic protein significantly inhibited VEGF-induced migration of HUVEC. [24] In our experimental setting, we also observed that a CRP treatment for 24 h reduced the EC migration in response to VEGF by more than 50% over the basal condition. Another important action of E2 is its ability to facilitate vascular repair by promoting angiogenic activity. Effectively, we previously demonstrated that reendothelialization improvement and vascular healing occurs by a local addition of E2 after vascular injury caused by coronary angioplasty. [31, 36] We have also shown the induction of EC proliferation and migration by this hormone via ER- α activation and p38 MAPK and ERK1/2 phosphorylation. [54] Since E2 increased the migratory ability of HAEC, we demonstrated that E2 pretreatment of 1 h prior to rhCRP stimulation counteracts the CRP effect and completely restores this cellular function. Our study demonstrates for the first time that E2, by inhibiting inflammatory activity of CRP, allowed an important pro-angiogenic pathway involved in vascular repair.

A major pro-inflammatory activity of CRP consists to downregulate endothelial NO synthase (eNOS) expression and activity resulting in a significant decrease in NO production by EC. [18] NO is a vasodilator that prevents platelet aggregation, supports vascular remodelling and plays also an important role in EC functions including VEGF-mediated migration response. [60] Inversely, E2 is known to promote NO production related to its non-genomic activation pathway. [30] Although our results confirm the role of NO in the migratory effect of E2 by the addition of a NOS enzyme inhibitor (L-NAME), enhanced migration activity attributed to the E2 pre-treatment of CRP-stimulated EC was insensitive to the addition of L-NAME. This indicates that NO is not part of the mechanism through which E2 counteracts the negative effect of the CRP on EC migration. To identify the E2 mechanism of action, we investigated the expression of VEGFR-2, a receptor that controls mitogenic action of VEGF. It is known to be downregulated in EC by CRP treatment which could explain the poor response to VEGF. [38] Furthermore, E2 proangiogenic activity is related to induction of VEGF production that may lead to increased expression of VEGFR-2 by a paracrine mechanism. [37, 61] However, we did not observe differences in

expression of this receptor or in the secretion of its ligand with all treatments used. Nevertheless, only a decrease in VEGFR-2 mRNA by CRP was demonstrated by Yang et al. [38] Also, another study reported that E2 up regulates VEGFR-2 expression in EC only after a long term treatment, showing a more likely involvement of the E2 genomic pathway rather than its rapid effects. These results point towards another mechanism used by E2 to counteract the effects of CRP on EC migration than an improvement in NO availability or induction of VEGFR-2 expression and VEGF secretion.

Thus, in this study, we demonstrate that EC could express CRP and become a site for CRP self-induction. We illustrate a process of positive feedback production of the protein by vascular cells that could be a source leading to exponential local increase found in sites of vascular injury. This pathological mechanism could contribute to endothelial dysfunction and vascular EC activation and represent a novel therapeutic target against atherosclerosis development. Furthermore, the present study highlights a novel vasoprotective role of E2 in the inhibition of this endogenous CRP self-induction altering its pro-inflammatory activities in vascular EC by a non genomic pathway. By exploring the angiogenic potential of E2, our study demonstrates for the first time that this hormone restores EC migration altered by CRP. This investigation may help to decipher mechanisms of E2 vascular protection by negative regulation of important proatherogenic inflammatory pathway controlled by CRP.

2.1.1.6 Acknowledgements

This project was supported financially by grants from the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC), Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal and TheCell (FRSQ) to Dr. Jean-François Tanguay.

None of the authors has competing financial interest to declare.

2.1.1.7 References

1. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
2. Mullenix, P.S., C.A. Andersen, and B.W. Starnes, *Atherosclerosis as inflammation*. Ann Vasc Surg, 2005. **19**(1): p. 130-8.
3. Lavie, C.J., R.V. Milani, and H.O. Ventura, *Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(21): p. 1925-32.
4. Karavidas, A., et al., *Aging and the cardiovascular system*. Hellenic J Cardiol, 2010. **51**(5): p. 421-7.
5. Beckman, J.A., M.A. Creager, and P. Libby, *Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management*. JAMA, 2002. **287**(19): p. 2570-81.
6. Reriani, M.K., L.O. Lerman, and A. Lerman, *Endothelial function as a functional expression of cardiovascular risk factors*. Biomark Med, 2010. **4**(3): p. 351-60.
7. Koenig, W., *Cardiovascular biomarkers: added value with an integrated approach?* Circulation, 2007. **116**(1): p. 3-5.
8. Ridker, P.M., *High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease*. Circulation, 2001. **103**(13): p. 1813-8.
9. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield, *C-reactive protein: a critical update*. J Clin Invest, 2003. **111**(12): p. 1805-12.
10. Berk, B.C., W.S. Weintraub, and R.W. Alexander, *Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease*. Am J Cardiol, 1990. **65**(3): p. 168-72.
11. Liuzzo, G., et al., *The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina*. N Engl J Med, 1994. **331**(7): p. 417-24.
12. Devaraj, S., U. Singh, and I. Jialal, *The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis*. Clin Chem, 2009. **55**(2): p. 229-38.
13. Calabro, P., J.T. Willerson, and E.T. Yeh, *Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells*. Circulation, 2003. **108**(16): p. 1930-2.
14. Ciubotaru, I., L.A. Potempa, and R.C. Wander, *Production of modified C-reactive protein in U937-derived macrophages*. Exp Biol Med (Maywood), 2005. **230**(10): p. 762-70.
15. Venugopal, S.K., S. Devaraj, and I. Jialal, *Macrophage conditioned medium induces the expression of C-reactive protein in human aortic endothelial cells: potential for paracrine/autocrine effects*. Am J Pathol, 2005. **166**(4): p. 1265-71.
16. Zhang, Y.X., et al., *Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis*. Atherosclerosis, 1999. **145**(2): p. 375-9.
17. Verma, S., P.E. Szmitko, and P.M. Ridker, *C-reactive protein comes of age*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2005. **2**(1): p. 29-36; quiz 58.

18. Venugopal, S.K., et al., *Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells*. Circulation, 2002. **106**(12): p. 1439-41.
19. Pasceri, V., J.T. Willerson, and E.T. Yeh, *Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells*. Circulation, 2000. **102**(18): p. 2165-8.
20. Devaraj, S., P.R. Kumaresan, and I. Jialal, *Effect of C-reactive protein on chemokine expression in human aortic endothelial cells*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **36**(3): p. 405-10.
21. Devaraj, S., et al., *CRP promotes monocyte-endothelial cell adhesion via Fcγ receptors in human aortic endothelial cells under static and shear flow conditions*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(3): p. H1170-6.
22. Fu, T. and J. Borensztajn, *Macrophage uptake of low-density lipoprotein bound to aggregated C-reactive protein: possible mechanism of foam-cell formation in atherosclerotic lesions*. Biochem J, 2002. **366**(Pt 1): p. 195-201.
23. Cirillo, P., et al., *C-reactive protein induces tissue factor expression and promotes smooth muscle and endothelial cell proliferation*. Cardiovasc Res, 2005. **68**(1): p. 47-55.
24. Schneeweis, C., et al., *Chronic CRP-exposure inhibits VEGF-induced endothelial cell migration*. J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(2): p. 203-12.
25. Barrett-Connor, E., *Sex differences in coronary heart disease. Why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture*. Circulation, 1997. **95**(1): p. 252-64.
26. Xing, D., et al., *Estrogen and mechanisms of vascular protection*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(3): p. 289-95.
27. Czubryt, M.P., et al., *The role of sex in cardiac function and disease*. Can J Physiol Pharmacol, 2006. **84**(1): p. 93-109.
28. Baker, L., et al., *The role of estrogen in cardiovascular disease*. J Surg Res, 2003. **115**(2): p. 325-44.
29. Mendelsohn, M.E. and R.H. Karas, *The protective effects of estrogen on the cardiovascular system*. N Engl J Med, 1999. **340**(23): p. 1801-11.
30. Chen, Z., et al., *Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen*. J Clin Invest, 1999. **103**(3): p. 401-6.
31. Chandrasekar, B., et al., *Local delivery of 17β-estradiol improves reendothelialization and decreases inflammation after coronary stenting in a porcine model*. Thromb Haemost, 2005. **94**(5): p. 1042-7.
32. Tanguay, J.F., *Vascular healing after stenting: the role of 17-β-estradiol in improving re-endothelialization and reducing restenosis*. Can J Cardiol, 2005. **21**(12): p. 1025-30.
33. Straub, R.H., *The complex role of estrogens in inflammation*. Endocr Rev, 2007. **28**(5): p. 521-74.
34. Mikkola, T.S. and R.W. St Clair, *Estradiol reduces basal and cytokine induced monocyte adhesion to endothelial cells*. Maturitas, 2002. **41**(4): p. 313-9.

35. Morales, D.E., et al., *Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model*. *Circulation*, 1995. **91**(3): p. 755-63.
36. Chandrasekar, B., S. Nattel, and J.F. Tanguay, *Coronary artery endothelial protection after local delivery of 17beta-estradiol during balloon angioplasty in a porcine model: a potential new pharmacologic approach to improve endothelial function*. *J Am Coll Cardiol*, 2001. **38**(5): p. 1570-6.
37. Herve, M.A., et al., *Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus*. *J Endocrinol*, 2006. **188**(1): p. 91-9.
38. Yang, H., et al., *C-reactive protein decreases expression of VEGF receptors and neuropilins and inhibits VEGF165-induced cell proliferation in human endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **333**(3): p. 1003-10.
39. Ridker, P.M., et al., *Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(20): p. 1557-65.
40. Koenig, W., et al., *C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992*. *Circulation*, 1999. **99**(2): p. 237-42.
41. Kuller, L.H., et al., *Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. Multiple Risk Factor Intervention Trial*. *Am J Epidemiol*, 1996. **144**(6): p. 537-47.
42. Yasojima, K., et al., *Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques*. *Am J Pathol*, 2001. **158**(3): p. 1039-51.
43. Ferri, C., et al., *C-reactive protein: interaction with the vascular endothelium and possible role in human atherosclerosis*. *Curr Pharm Des*, 2007. **13**(16): p. 1631-45.
44. Verma, S., et al., *Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein*. *Circulation*, 2002. **105**(16): p. 1890-6.
45. Taylor, K.E., J.C. Giddings, and C.W. van den Berg, *C-reactive protein-induced in vitro endothelial cell activation is an artefact caused by azide and lipopolysaccharide*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(6): p. 1225-30.
46. Calabro, P., E. Golia, and E.T. Yeh, *CRP and the risk of atherosclerotic events*. *Semin Immunopathol*, 2009. **31**(1): p. 79-94.
47. Verma, S., et al., *C-reactive protein activates the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and restenosis*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003. **126**(6): p. 1886-91.
48. *Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial*. *JAMA*, 1995. **273**(3): p. 199-208.

49. Stampfer, M.J., et al., *Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study.* N Engl J Med, 1991. **325**(11): p. 756-62.
50. Duvernoy, C., *Estrogen and C-reactive protein: does an alternate route lead to a more attractive destination?* Thromb Haemost, 2003. **90**(1): p. 1-2.
51. Lacut, K., et al., *Differential effects of oral and transdermal postmenopausal estrogen replacement therapies on C-reactive protein.* Thromb Haemost, 2003. **90**(1): p. 124-31.
52. Wang, D., et al., *Estrogen treatment abrogates neointima formation in human C-reactive protein transgenic mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(10): p. 2094-9.
53. Leung, S.W., et al., *Non-genomic vascular actions of female sex hormones: physiological implications and signalling pathways.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007. **34**(8): p. 822-6.
54. Geraldes, P., et al., *Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(10): p. 1585-90.
55. Geraldes, P., M.G. Sirois, and J.F. Tanguay, *Specific contribution of estrogen receptors on mitogen-activated protein kinase pathways and vascular cell activation.* Circ Res, 2003. **93**(5): p. 399-405.
56. Sullivan, G.W., I.J. Sarembock, and J. Linden, *The role of inflammation in vascular diseases.* J Leukoc Biol, 2000. **67**(5): p. 591-602.
57. Rodriguez, E., et al., *17Beta-estradiol inhibits the adhesion of leukocytes in TNF-alpha stimulated human endothelial cells by blocking IL-8 and MCP-1 secretion, but not its transcription.* Life Sci, 2002. **71**(18): p. 2181-93.
58. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms.* Circ Res, 2007. **100**(2): p. 158-73.
59. Schwartz, R., et al., *C-reactive protein downregulates endothelial NO synthase and attenuates reendothelialization in vivo in mice.* Circ Res, 2007. **100**(10): p. 1452-9.
60. Papapetropoulos, A., et al., *Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells.* J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 3131-9.
61. Suzuma, I., et al., *17 Beta-estradiol increases VEGF receptor-2 and promotes DNA synthesis in retinal microvascular endothelial cells.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**(9): p. 2122-9.

2.1.1.8 Figure Legends

Figure. 1 CRP auto-induction in a dose dependant manner. CRP protein expression was evaluated following HAEC treatment with increasing concentrations of rhCRP (1; 2,5; 5; 10 and 25 ug/ml) for 24 h. CRP protein level in cell lysate was determined by western blot analysis and normalized to the level of β -actin protein. Data represent the means \pm SEM (N=4). **** $p < 0,001$ vs. CRP 25ug/ml; * $p < 0,01$ vs. CRP 25ug/ml.**

Figure. 2 CRP self-induction and negative regulation by an E2 pre-treatment. CRP protein expression was evaluated following a 1h E2 pretreatment (10^{-8} and 10^{-9} M) and a 24h stimulation of rhCRP (25ug/ml) either alone or in combination. CRP protein level was determined by western blot analysis and normalized to the level of β -actin protein. Data represent the means \pm SEM (N=8). **** $p < 0,001$ vs. not stimulated (NS); § $p < 0,01$ vs. CRP.**

Figure. 3 Cytokines (IL-6 and IL-8) secreted by HAEC. IL-6 and IL-8 secretion was evaluated in the supernatant of HAEC stimulated with increasing concentration of rhCRP (1; 2,5; 5; 10 and 25ug/ml) for 24 h, a 1h E2 pretreatment (10^{-8} and 10^{-9} M) alone or in combination. An ELISA assay was used to measure IL-6 level (A, C) and IL-8 level (B, D) in culture supernatants. Data represent the means \pm SEM. N=5 (A); N=4 (B); N=3 (C); N=5 (D). **** $p < 0,001$ vs. CRP 25 ug/ml.(A,B); ** $p < 0,001$ vs. NS; § $p < 0,01$ vs. CRP(C). ** $p < 0,001$ vs. NS; § $p < 0,05$ vs. CRP(D).**

Figure. 4 VCAM-1 and ICAM-1 total protein expression in HAEC. VCAM-1 and ICAM-1 protein expression was evaluated in the supernatants of HAEC stimulated with increasing concentrations of rhCRP (1; 2,5; 5; 10 and 25ug/ml) for 24 h, a 1h E2 pretreatment (10^{-8} and 10^{-9} M) alone or in combination. VCAM-1 (A, C) and ICAM-1 (B, D) protein level was determined by western blot analysis in cell lysate and normalized to the level of β -actin protein. Data represent the means \pm SEM. N=2 (A); N=2 (B); N=4 (C);

N=4 (D) *** $p < 0,001$ and; ** $p < 0,01$ and; * $p < 0,05$ vs. NS; § $p < 0,05$ (C). *** $p < 0,001$ and; ** $p < 0,01$ vs. NS (D).

Figure. 5 E2 restore the migratory response of CRP stimulated HAEC to VEGF.

HAEC migration towards VEGF was determined following E2 pretreatment (10^{-9} M) of 1 h and stimulation of rhCRP (25ug/ml) of 24 h either alone or in combination. L-NAME (10^{-4} M) was added 30 min prior E2 treatment. Migration assay was carried out by Transwell chamber migration method. VEGF was used as the chemoattractant and added to culture media in the lower compartment of Transwell plate at 20ng/ml. L-NAME was also added to both the upper and lower compartment in control wells. HAEC migration is shown as a percentage of VEGF-induced increased compared to the average of unstimulated cells in basal condition. Data represent the means \pm SEM (N=3). * $p < 0,05$ vs. NS; § $p < 0,05$ vs. CRP; §§ $p < 0,01$ vs. CRP; ‡ $p < 0,01$ vs. E2.

Figure. 6 VEGF secretion and VEGFR-2 expression by HAEC.

VEGF secretion and VEGFR-2 expression was determined after HAEC stimulation with a 24 h rhCRP (25ug/ml) treatment and a 1h E2 pretreatment (10^{-8} and 10^{-9} M) alone or in combination. An ELISA assay was used to measure VEGF in culture supernatants of HAEC (A). VEGFR-2 expression was evaluated on cells surface by flow cytometry and data are presented as MFI values (B). Data represent the means \pm SEM. N=3 (A, B).

2.1.1.9 Figures

Figure 1.

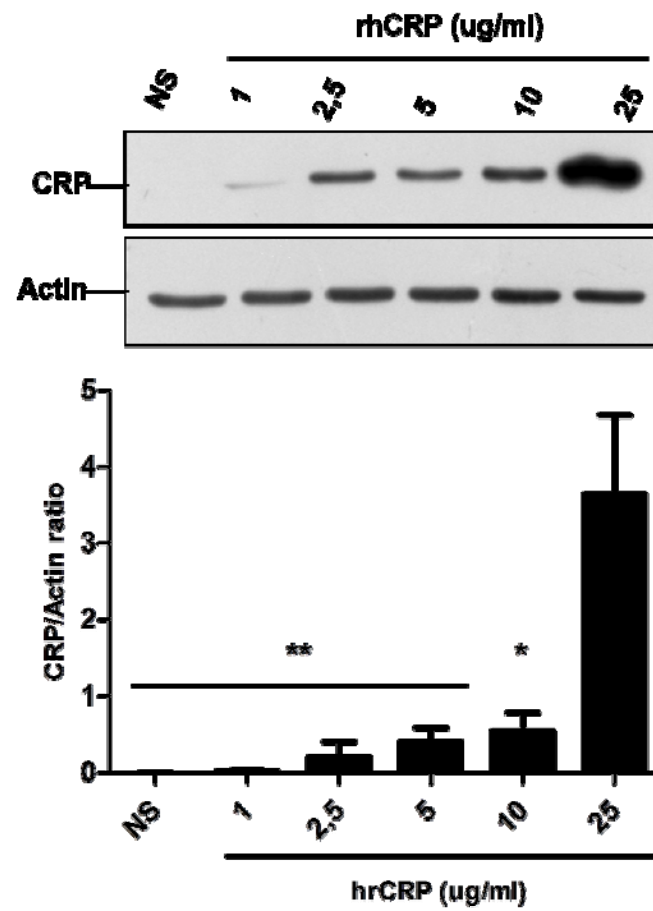


Figure 2.

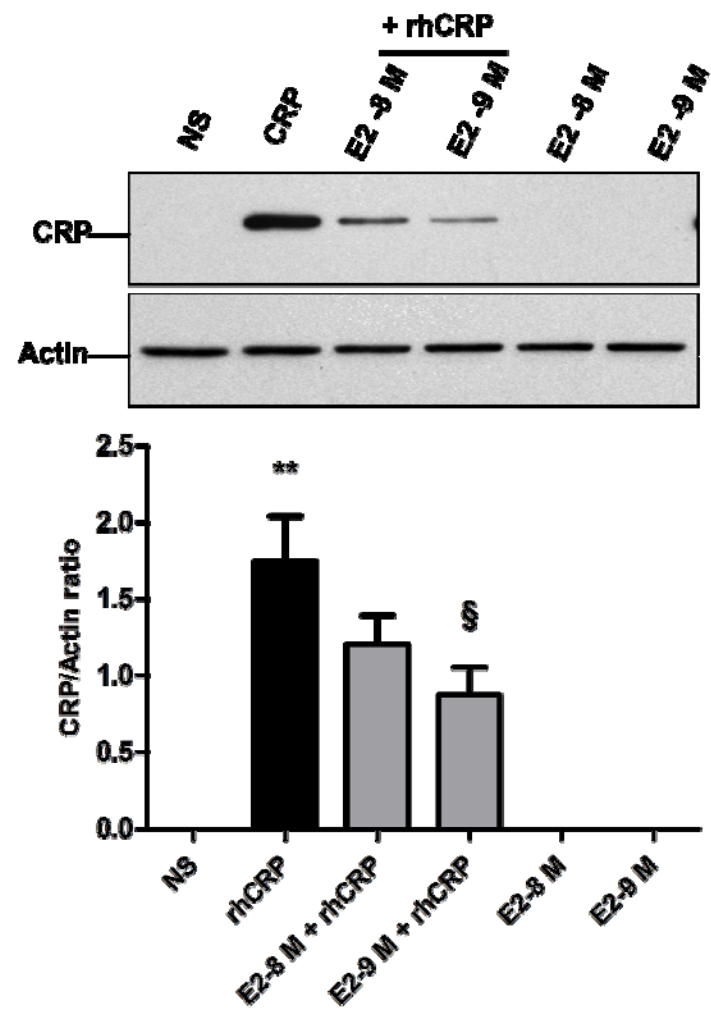


Figure 3.

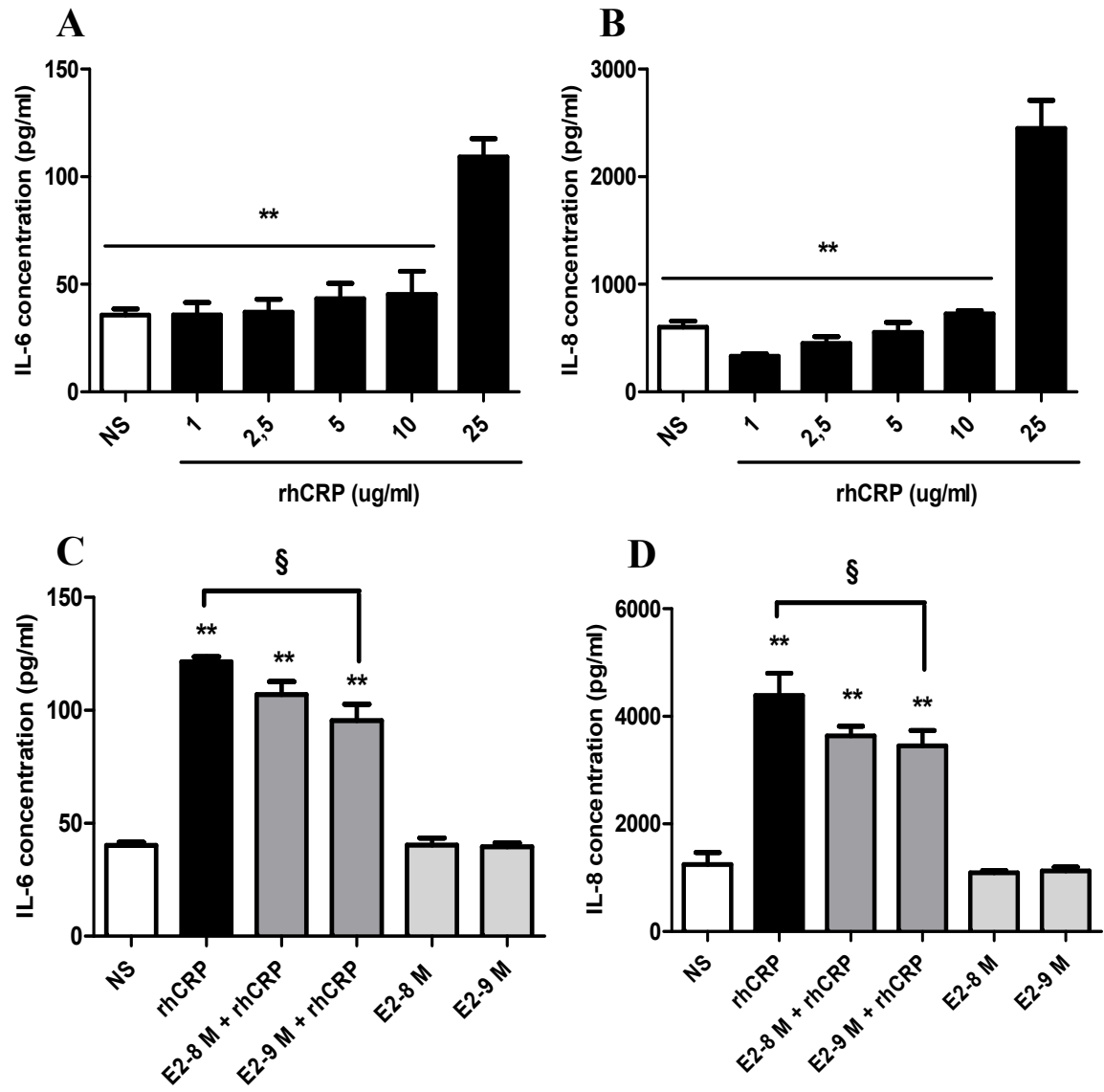


Figure 4.

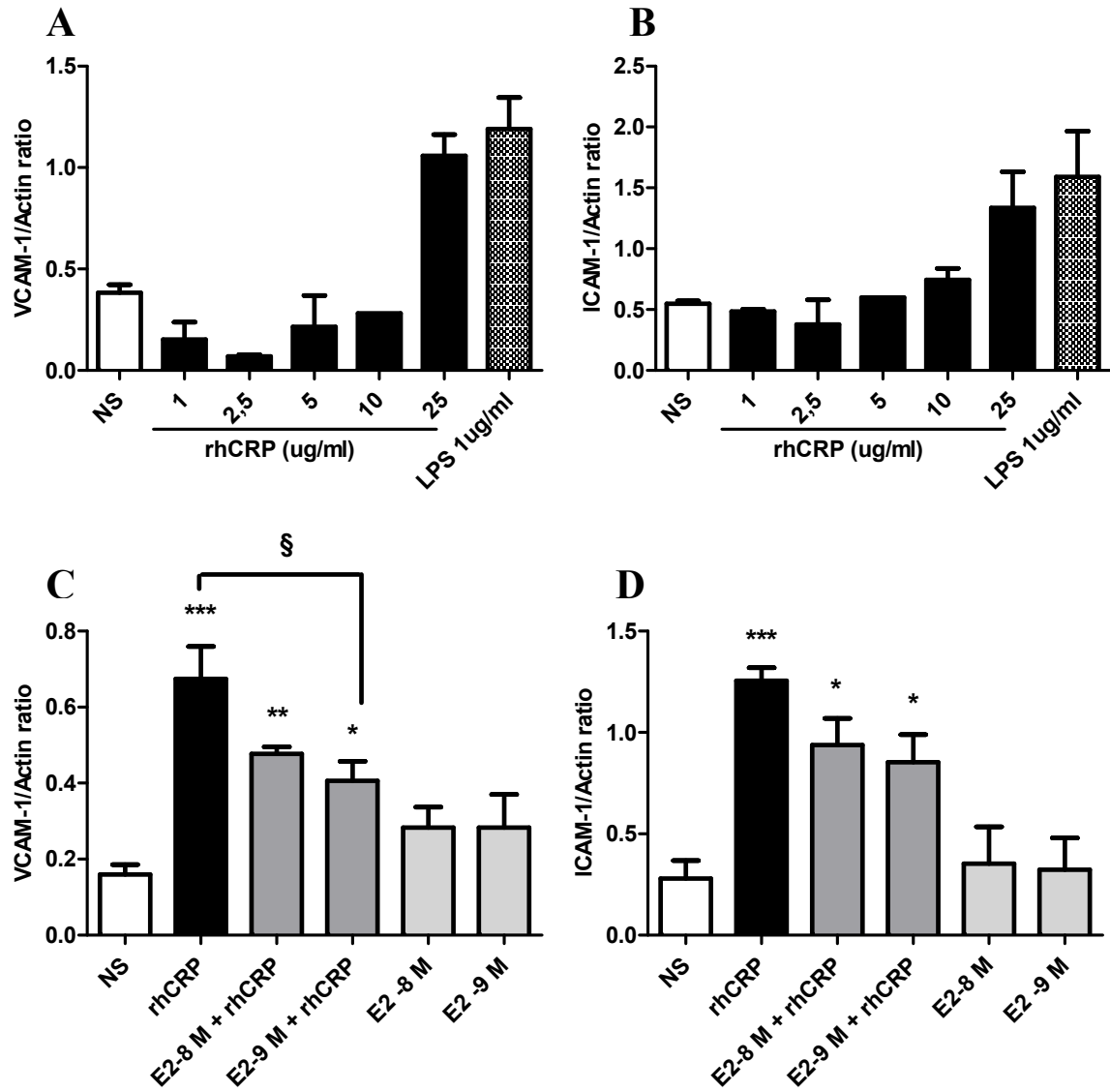


Figure 5.

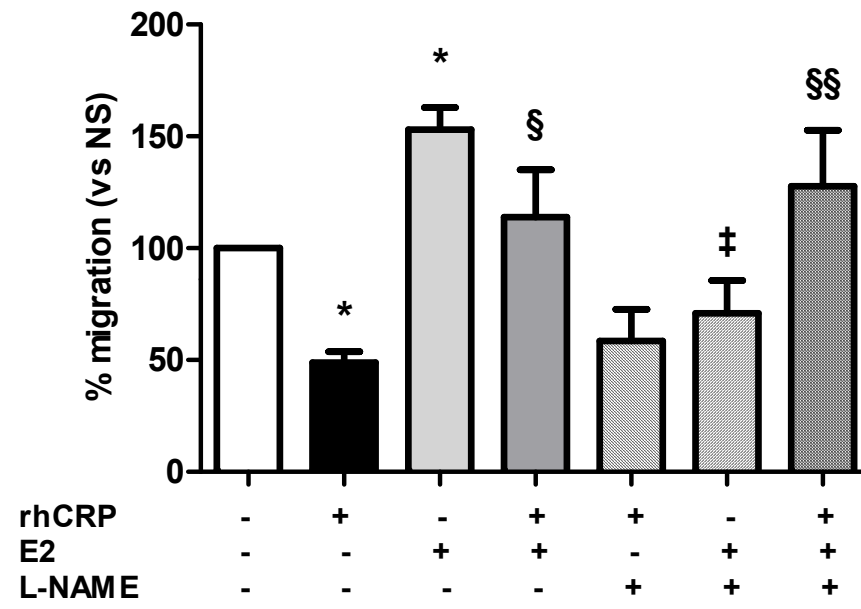
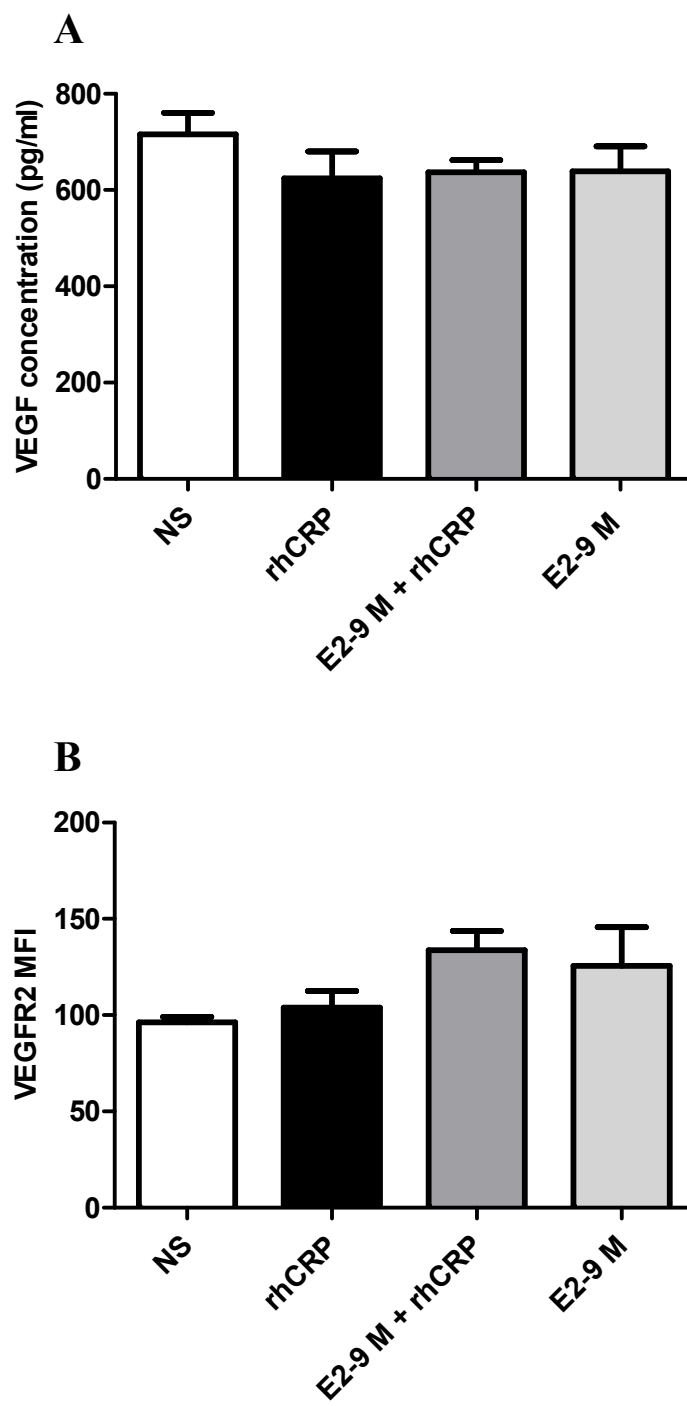


Figure 6.



3. Discussion

Le but principal de mes travaux consistait à évaluer la capacité de l'E2 à inhiber l'activation pro-inflammatoire induite par la CRP dans les CE vasculaires humaines, un phénomène enclenché durant la formation de l'athérosclérose. Cet objectif devait être accompli en premier lieu, par l'étude de l'habileté de l'E2 à bloquer ou réduire l'induction de l'expression de molécules pro-inflammatoires modulée par la CRP, et ce, en interférant directement sur la production endogène de CRP par les CE et/ou ses mécanismes d'activation. En deuxième lieu, nous voulions évaluer l'aptitude de l'E2 à rétablir une importante voie de réparation vasculaire altérée par cette protéine pentamérique, c'est-à-dire à favoriser la migration des CE induite par le VEGF et ainsi contrer un des effets pro-athérogéniques de la CRP.

Le premier volet de cette étude était donc basé sur l'inhibition de l'activité pro-inflammatoire des CE provoquée par la présence et l'augmentation de l'expression de la CRP. Tout d'abord, il a été établi par le passé que la CRP était sécrétée par les hépatocytes du foie suite à une infection ou une inflammation systémique. [62] Par la suite, des études ont démontré une production extra-hépatique de la protéine plasmatique, cette dernière étant produite par d'autres cellules présentes dans l'intima vasculaire telles que les CE. [65] Le mécanisme de régulation de la production de la CRP n'ayant pas été exploré de façon approfondie jusqu'à maintenant, nos travaux ont permis de démontrer que les CE expriment non seulement la CRP, mais peuvent également être le site de son auto-induction. En fait, l'IL-6, l'agoniste le plus important de la sécrétion de CRP par les HAEC, est elle-même induite par la protéine. [65, 82] Nous avons donc établi que les CE humaines ont la capacité d'induire une boucle de rétroaction positive sur la production de cette protéine pro-athérogénique. Comme cette auto-induction représente une cible importante dans la prévention du développement inflammatoire de l'athérosclérose, la capacité de l'E2 à réduire cette amplification de la sécrétion de CRP a été évaluée. En effet, une diminution significative de son auto-induction par les CE est présentée dans nos travaux suite à un pré-traitement à l'E2. De plus, il est connu qu'une hausse importante de sa production aux sites de lésions athéromateuses est suivie par l'augmentation de l'expression de molécules pro-inflammatoires par les CE. [84, 85] Nos résultats ont mis en lumière qu'il était possible de

diminuer grâce à l'E2 cette étape pro-athérogénique induite par la CRP. Ainsi, la sécrétion de cytokines inflammatoires et l'expression de molécules d'adhésion induites par la protéine sont réduites considérablement par un pré-traitement d'E2.

Ayant démontré que l'E2 régule négativement l'activité pro-inflammatoire des CE modulée par la CRP, le deuxième volet de ces travaux de maîtrise portait sur la possibilité que cette hormone puisse favoriser un des mécanismes de réparation de l'endothélium altérée par la protéine pentamérique. Cette dernière réduit fortement la migration des CE induite par le VEGF.[165] Notre laboratoire a établi par le passé que l'E2 contribuait à diminuer la formation de néointima et le risque de resténose suite à une blessure vasculaire provoquée par une angioplastie et accélérât la réendothélisation, favorisant ainsi la guérison vasculaire.[141, 142] Notre étude a fait valoir, dans un contexte *in vitro*, la contribution de cette hormone féminine dans la réparation vasculaire puisqu'elle permet de rétablir la réponse migratoire des CE au VEGF, bloquant l'effet inhibiteur de la CRP. Selon nos premières investigations mécanistiques, nous savons que l'action de l'E2 sur ce phénomène n'inclut pas l'amélioration de la disponibilité du NO ni l'induction de l'expression de VEGFR-2 ou de la sécrétion de VEGF par les CE. D'autres études devront être menées afin de déterminer le mécanisme employé par l'E2 pour augmenter et rétablir la capacité migratoire des CE.

Cette étude nous a donc permis d'élargir nos connaissances au niveau de la production de CRP par les CE vasculaires, mais également sur les mécanismes anti-inflammatoires modulés par l'E2. En effet, nous avons établi que cette dernière régule négativement une importante voie pro-athérogénique inflammatoire induite par la CRP, contrant ses effets sur la migration et l'activation des CE. Pour compléter ces travaux, les mécanismes impliqués dans l'auto-induction de la CRP et utilisés par l'E2 pour réduire l'activité de cette dernière pourront être investigués dans le futur.

3.1 Formation de la CRP monomérique lors de la purification de la protéine

3.1.1 Implications des contaminants dans la solution commerciale de la CRP

La CRP recombinante humaine (rhCRP) utilisée dans ce projet de recherche était fournie par la compagnie Lee Biosolutions Inc. Cette préparation commerciale de rhCRP est produite à partir de la bactérie *Escherichia coli* (E. coli). Par une technologie brevetée, la bactérie E. Coli en fermentation et comportant le gène de CRP humain permet la sécrétion de la rhCRP dans le milieu de culture. Cette technique permet l'accumulation de la protéine recombinante sans lyse et assure la production de rhCRP active équivalente à sa forme pentamérique.[169] Par conséquent, la solution commerciale contient inévitablement des endotoxines bactériennes telles les lipopolysaccharides (LPS). De plus, le sodium azide (NaN_3), un important agent de conservation, est également ajouté à la solution afin de prévenir la contamination des réactifs par des bactéries ou champignons. [170] Le NaN_3 agit comme bactériostatique et empêche la reproduction de pathogènes en inhibant le cytochrome c oxydase de la chaîne respiratoire du transport d'électron de ces derniers. [171] Il est particulièrement utilisé pour différents réactifs et solutions stocks telles que les anticorps.

Les endotoxines et le NaN_3 présents dans la solution de rhCRP représentent des artéfacts important puisque qu'ils peuvent influencer l'activité biologique de la protéine tels qu'invoqués par plusieurs auteurs. En effet, une étude a démontré que certaines activités inflammatoires de la CRP sur les CE incluant la sécrétion de MCP-1, d'IL-8 et de vWF étaient perdues lors de la purification de la protéine et que le NaN_3 et le LPS, seuls ou combinés, pouvaient plutôt induire ces effets. [172] Des actions proapoptotiques, antimigratoires, antiprolifératives et anti-angiogéniques de la rhCRP sur les CE ont été montrées, par une seconde étude, comme étant dues plutôt à la présence de NaN_3 dans la solution commerciale. [173] Cependant, plusieurs autres évidences suggèrent que les effets

observés sont réellement médiés par la CRP et non dus aux contaminants. Effectivement, diverses études *in vitro* ont utilisé de la CRP bouillie et trypsinisée comme contrôles négatifs, ces derniers ne pouvant reproduire les effets de la protéine native. Aussi la CRP incubée avec la polymyxine B se liant au LPS n'altère pas les effets de la protéine. [10] Bisoendial et al. prouvent que la faible concentration d'endotoxines retrouvée dans la solution commerciale n'est pas suffisante pour contribuer aux effets inflammatoires. [174] De plus, l'effet pro-athérogénique de la CRP est indépendant de l'activité du LPS est soutenu par la parution d'un article utilisant des HAEC transfectées avec de petits ARN interférents avec l'expression du TLR4 (*Toll-like receptor 4*), le récepteur responsable de l'activation inflammatoire du LPS de *E. coli*. [175] Cependant, il est connu que le LPS peut également lier et activer un autre récepteur de la même famille chez les CE, le TLR2, et l'inhibition de ce dernier n'a pas encore été testé. [176, 177]

3.1.2 La purification de la CRP entraîne un changement de conformation

Le risque d'artéfacts liés à la présence de contaminants lorsque de la rhCRP commerciale est utilisée reste une préoccupation et nécessite l'utilisation de contrôles adéquats. La meilleure façon, suggérée et fortement recommandée, afin de s'assurer de résultats valides est d'éliminer les endotoxines et le NaN_3 de la solution protéique avant son utilisation. Nous avons donc testé une procédure retrouvée dans la littérature consistant, tout d'abord, à dialyser la solution commerciale par un processus d'osmose pour enlever le NaN_3 . Le LPS est par la suite éliminé par un passage de la protéine sur une colonne de chromatographie d'affinité. Cette dernière munie d'une matrice de polymyxine B permet la rétention du LPS et l'élution de la CRP purifiée. L'absence d'endotoxine résiduelle est confirmée par un essai chromogénique utilisant le principe de LAL (*limulus Amebocyte lysate*).

Pour les premières mises au point effectuées, seule la rhCRP détoxifiée par cette technique a été utilisée. Par contre, suite à la stimulation des HAEC avec cette protéine purifiée, les premiers résultats obtenus de ces mises au point se sont avérés très variables d'une stimulation à l'autre. De plus, une fois que la solution protéique était ajoutée au

milieu de culture, nous avons observé au microscope la formation d'agrégats, ce qui n'était pas le cas de la rhCRP non détoxifiée. La méthode de purification a alors été remise en question et révérifiée face à ces observations.

Une étude affirme que suite à sa dissociation irréversible, la forme pentamérique, devenant sous forme monomérique, la mCRP possède alors une solubilité beaucoup plus faible en milieu aqueux et tend à s'agréger en matrice semblable à une structure de treillis. [178] De plus, plusieurs équipes de recherche ont consacré leurs travaux à démontrer les activités biologiques distinctes des deux isoformes. Ce sujet est très controversé dans la littérature et les effets inflammatoires de chaque isoforme ne font pas l'unanimité. Devaraj et al. établissent que la protéine native possède une activité pro-athérogénique plus puissante que la mCRP. [179] De leur côté, Khreiss et al. assurent qu'un réarrangement conformationnel de la protéine sous la forme monomérique est requis pour effectuer ses actions pro-inflammatoires. [180] Ces études s'entendent par contre sur le fait que les deux isoformes exercent des effets inflammatoires différents. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'un certain pourcentage de la protéine pentamérique de notre solution mère subissait un changement conformationnel irréversible. Cette supposition pouvait expliquer la variabilité de nos résultats avec la CRP détoxifiée. Afin d'évaluer cette possibilité, nous avons tenté de déterminer le ratio de pCRP/mCRP présent dans notre solution protéique. La technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec seulement $1/20^{\text{ème}}$ de SDS (*sodium dodecyl sulfate*) a été choisie pour évaluer la présence de mCRP dans notre solution stock de rhCRP purifiée (Figure 8). Cette méthode est priorisée par l'équipe de recherche de Taylor et al. puisque la forme monomérique ne peut être détectée sur un gel d'électrophorèse complètement non dénaturant probablement dû à sa baisse de solubilité en milieu aqueux. [181] Le SDS confère aux protéines une charge négative proportionnelle à leur masse. Cependant, sous des conditions de $1/20^{\text{ème}}$ de SDS, la charge de la protéine peut elle-même affecter l'activité électrophorétique et ainsi moduler la vitesse de migration de la CRP à travers le gel. Les deux isoformes ne possédant pas les mêmes propriétés électrophorétiques, ce principe explique les différents poids moléculaires observés pour les deux isoformes dans le gel, soit environ 150 kDa pour la pCRP et 45 kDa pour la mCRP.

Selon les résultats obtenus, la majeure partie de la CRP est sous forme pentamérique dans la solution détoxifiée, mais semble plus faible que le contrôle, c'est-à-dire la CRP native commerciale non purifiée. Si la protéine détoxifiée contient la forme monomérique, elle est en trop faible concentration pour être détectée par cette méthode. Pour une plus grande sensibilité de détection, nous avons aussi envisagé effectuer un immunobuvardage de type western en utilisant un anticorps spécifique de la forme monomérique de la CRP. Cependant, l'anti-mCRP clone 9C9 utilisé dans certaines études [55] possède une reconnaissance croisée avec la protéine de choc thermique HSP60. [182] De plus, le seul autre anticorps dirigé contre la mCRP connue est produit par le laboratoire de Potempa et al. et n'est pas disponible commercialement. [183] Très récemment, l'équipe de recherche de Wang et al. a mis au point une sonde dite aptamère se liant exclusivement à la mCRP dans le but d'obtenir un outil analytique valable pour distinguer les deux isoformes de la protéine. L'aptamère, consistant en un ARN simple brin, se lie sélectivement à la molécule cible par la méthode SELEX (*systemic evolution of ligands by exponential enrichment*). La présence de mCRP est démontrée par l'utilisation de cette sonde avec les techniques d'anisotropie de fluorescence, dot blot et EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*). [184] Cette méthode pourrait être utilisée ultimement dans un projet futur afin de distinguer la présence des deux formes de la CRP dans une solution.

Malgré tout, nos résultats indiquent que la proportion de pCRP semblait être réduite dans la solution protéique détoxifiée. La variabilité des premiers résultats obtenus pour les mises au point était alors fort probablement reliée à la précipitation de la protéine, ce qui ne permettait pas de contrôler la quantité de pCRP réellement disponible.

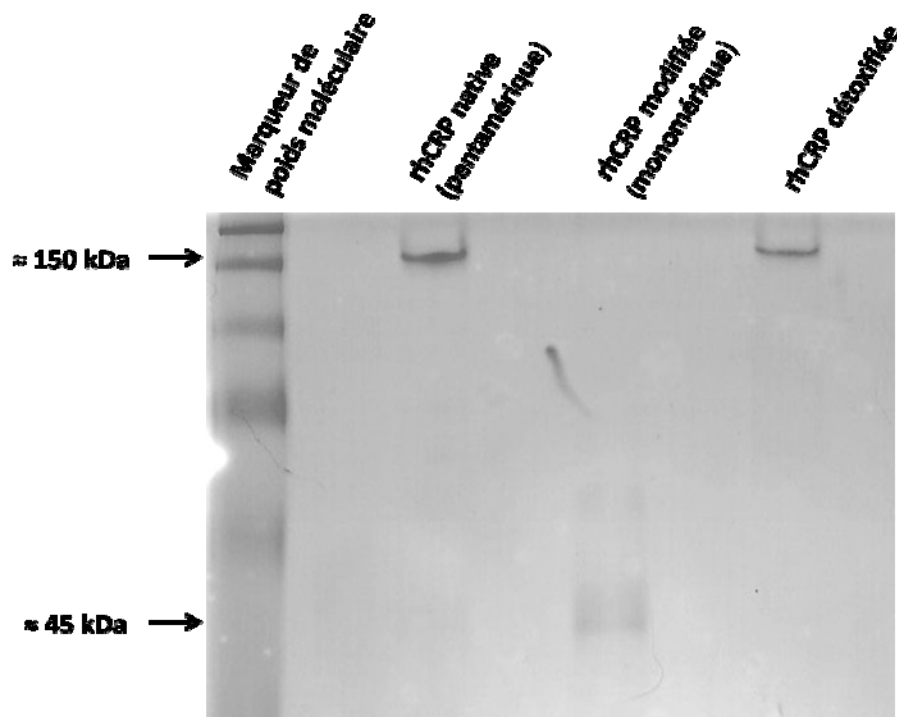


Figure 8. Évaluation de l'isomérisation de la CRP détoxifiée. Les isoformes de CRP présentes dans la solution détoxifiée sont évaluées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant 1/20^{ème} de SDS. Les protéines sont visualisées par coloration au bleu de Coomassie. La CRP native est utilisée comme contrôle pour la forme pentamérique et celui de la forme monomérique est produit selon la technique de Taylor et al, c'est-à-dire à partir de CRP native chauffée à 70°C pendant 1 h. [181] Pour chaque échantillon, 10 µg de protéines sont ajoutés aux puits.

3.1.3 Solutions choisies et changements apportés à la méthode de purification

Ces observations nous ont amené à ajuster la méthode de purification de la rhCRP. Tel que mentionné précédemment, la protéine se dissocie irréversiblement en présence de chélateur d'urée, de chaleur, d'acide, d'un faible pH ou en absence de calcium.[52] Nous avons alors vérifié si notre méthode respectait toutes ces conditions. Comme la protéine

pentamérique n'était pas exposée à la chaleur ou à des chélateurs d'urée et que le pH de la solution était neutre, nous avons émis l'hypothèse que la concentration de calcium de la solution devait être insuffisante. La rhCRP fournie par la compagnie est normalement conservée dans un tampon comportant 2 mM de CaCl_2 . Cependant, lors de la purification, la solution protéique était légèrement diluée lors des étapes de chargement et de rinçage recommandées par le fabricant de la colonne d'affinité (GenScript). La protéine était alors diluée avec une solution tampon inconnue de la compagnie dite d'« Équilibration », diminuant la concentration de calcium dans le milieu. Son entreposage à long terme dans une solution ne contenant pas un minimum de 2 mM de calcium peut résulter en une conversion spontanée de pCRP à mCRP. [185] Nous avons alors opté pour un autre kit provenant de Fisher Scientific utilisant également le principe de chromatographie d'affinité mais qui s'est avéré plus précis et plus efficace. Ce dernier ne diluait que très peu la solution commerciale de rhCRP. De plus, ce kit fournissait les protocoles pour préparer nous-mêmes les solutions tampons utilisées lors de la purification, nous permettant de nous assurer d'une quantité suffisante de calcium pour éviter une possible dissociation de la pCRP. Suite à ces modifications, aucun agrégat n'a été observé dans la solution de rhCRP purifiée ni dans le milieu de culture lors des stimulations. Aussi, nos résultats étant plus constants, confirment que la protéine conservait sa conformation pentamérique lors de sa purification. Cette méthode nous a donc permis de poursuivre nos travaux avec un haut degré de confiance dans la validité des résultats obtenus.

3.2 Auto-induction de l'expression de la CRP par les CE vasculaires

3.2.1 Expression de la CRP par les HAEC

L'activation de la réponse inflammatoire suite à une infection, une blessure de la paroi ou d'un changement de l'homéostasie vasculaire est fortement impliquée dans le développement de l'athérosclérose. Les déclencheurs de l'inflammation incluent le biomarqueur CRP participant non seulement à la première étape du développement de la maladie athérosclérotique, c'est-à-dire la dysfonction endothéliale, mais également à l'activation endothéliale, la formation et la rupture de la plaque lipidique. Effectivement, la CRP cause une réponse inflammatoire importante entre autres, en induisant l'expression de molécules pro-inflammatoires et la migration des leucocytes au site de lésion. Elle est donc très active dans les lésions athérosclérotiques et présente en forte concentration localement aux sites inflammatoires. Cette dernière affirmation a tout d'abord été présentée par une étude orientée sur le rôle de la CRP comme important activateur du complément. [66] Les résultats de cette équipe de recherche indiquent que la protéine pentamérique co-localise avec le complexe terminal du complément dans l'intima d'artères coronaires. À cette époque, il fut proposé que la CRP plasmatique originait exclusivement du foie pour être par la suite déposée aux sites de lésions artérielles où elle participait à l'athérogénèse par l'activation du complément. [62] En effet, les cellules du foie représentent la principale source de CRP retrouvée dans le sang. [186] Son augmentation locale suite à une blessure tissulaire était donc attribuée uniquement à l'activation des hépatocytes par des cytokines inflammatoires, principalement l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF- α . [60]

Toutefois, la CRP est une protéine de défense de l'hôte dont les origines phylogénétiques remontent d'aussi loin que le limule. [187] Il est alors escompté que d'autres tissus de l'organisme aient conservé la capacité de générer cette protéine comme mécanisme de défense du système immunitaire innée. Une production extra-hépatique a été énoncée pour la première fois dans une étude de Yasojima et al. démontrant la synthèse de

CRP et SAP dans les neurones du cerveau. [188] Cette même équipe de recherche affirme un peu plus tard que la CRP est également exprimée dans les lésions athéromateuses et générée de façon endogène par les cellules de l'intima. Son taux était en fait 10,2 fois plus élevé dans les tissus de plaques athérosclérotiques que dans les artères normales et 7,2 fois plus grand que dans le foie. Par hybridation *in situ* et immunohistochimie, ils confirment aussi la présence de cette protéine chez les CMLV et les macrophages dans l'intima de plaques athérosclérotiques. [63] Également, une expérience *in vivo* chez des patients présentant un syndrome coronarien aigu et une maladie coronarienne stable confirme une production locale de la CRP au niveau de la paroi artérielle. En effet, une forte concentration protéique de la hsCRP est détectée à partir d'un échantillon sanguin collecté à l'aide d'un cathéter dans la région de la lésion vasculaire. De plus, suite à une blessure de la paroi vasculaire causée par une intervention coronarienne percutanée, la quantité de CRP produite au niveau des lésions augmente en fonction du temps. [189]

Ces observations suggèrent donc une production locale de CRP au niveau de l'intima beaucoup plus élevée et distincte du taux plasmatique. Son expression est ensuite rapportée dans les cellules mononucléaires périphériques, les adipocytes, les cellules épithéliales rénales, les CMLV et les CE. [65, 190-192] Effectivement, les CMLV d'artères coronaires humaines synthétisent la CRP en réponse à différents stimuli inflammatoires dont l'IL-6 l'IL-1 β et le TNF- α . [64] Les CE vasculaires, activées lors du développement de lésions athérosclérotiques et fortement impliquées dans le processus, produisent également la protéine en réponse à l'inflammation et à différents facteurs métaboliques. Venugopal et al. ont démontré une hausse de sa production par les HAEC et HCAEC suite à une stimulation avec du milieu conditionné de macrophages. De plus, ces derniers établissent que le plus important agoniste de la production de CRP chez les HAEC est la combinaison synergétique d'IL-6 et d'IL-1 β . [65] Les CE vasculaires possèdent donc la capacité d'exprimer la CRP et de contribuer ainsi à la hausse rapide de sa concentration locale aux sites de lésion.

L'IL-6, définie comme étant le plus important agoniste de la production de CRP et responsable de son induction transcriptionnelle chez les CE, est elle-même induite par la

CRP plasmatique. [82] De plus, les données d'une étude suggèrent l'existence d'une importante relation mécanistique entre la CRP et l'IL-6 reliée en partie à l'activité pro-athérogénique de la protéine. En effet, l'ajout d'un anticorps dirigé contre l'IL-6 lors de stimulations par la CRP atténue l'effet pro-inflammatoire de la protéine en entraînant la diminution de l'expression des molécules d'adhésion, de la sécrétion de MCP-1 et de la phagocytose des LDL par les macrophages. [82] Ceci suggère l'existence d'un rétrocontrôle positif autocrine/paracrine par les CE de la production de CRP, contribuant à l'élévation de sa concentration locale. Mon projet de recherche était tout d'abord basé sur la démonstration de cette auto-induction possible par les CE vasculaires humaines avec l'utilisation d'une rhCRP. Pour ce faire, les cellules étaient d'abord traitées avec la CRP recombinante humaine pour ensuite être lysées. La proportion de CRP produite par les CE était évaluée par la suite par la technique d'immunobuvardage de type western. Afin de distinguer la CRP produite par les HAEC de la protéine recombinante ajoutée et d'éliminer les artéfacts provenant de cette dernière, les cellules étaient lavées à plusieurs reprises suite au traitement avant d'être lysées. Nos résultats démontrent clairement une augmentation dose-dépendante de cette même protéine. La plus forte dose de 25 ug/ml utilisée dans cette expérience entraîne une auto-induction cinq fois plus grande que les autres concentrations de rhCRP utilisées. Ce résultat est représentatif de l'augmentation exponentielle causée par un rétrocontrôle positif de la protéine sur sa propre expression et suggère que la proportion de CRP observée ne peut être causée seulement par l'adhésion ou l'ingestion de cette dernière par les cellules. Ces observations sont les premières à confirmer une auto-induction de la protéine pentamérique par les CE humaines. Donc, la synthèse et la sécrétion de la CRP résultant d'une boucle autocrine/paracrine générée par les CE présentes dans la lésion athérosclérotique pourraient entraîner l'augmentation locale de sa concentration par rapport à son taux plasmatique et contribuer ainsi à ses effets pro-inflammatoires et pro-athérogéniques.

Afin de déterminer si l'IL-6 serait à l'origine de cette boucle d'expression protéique, l'utilisation d'un anticorps anti-IL-6 lors d'une stimulation à la rhCRP serait une expérience très intéressante à effectuer. De plus, l'IL-6 participe à l'activation transcriptionnelle du

gène de la CRP principalement par l'activation du facteur de transcription nucléaire STAT3 au niveau du foie. Également, une étude affirme que la même voie, JAK/STAT-3, activée par la liaison de l'IL-6 à son récepteur, est aussi empruntée pour induire l'expression de la protéine dans les CE. [193] Il serait alors pertinent d'évaluer l'implication du facteur STAT-3 dans l'auto-induction de la CRP à l'aide d'inhibiteurs spécifiques.

3.2.2 Diminution de l'auto-induction de la CRP par l'E2

L'élévation de la production de CRP aux lésions athérosclérotiques par les CE vasculaires représente une étape majeure de son implication dans le développement d'une réponse inflammatoire importante. Toutefois, son expression peut être modulée par différents agonistes et antagonistes. La leptine induit l'expression protéique de la CRP chez les HCAEC via la stimulation du récepteur de cette hormone lipidique. [26] L'ANG II, la principale hormone peptidique du système rénine-angiotensine, joue un rôle de vasoconstricteur dans la dysfonction endothéliale et possède également un effet pro-inflammatoire. En effet, elle a la capacité d'induire la sécrétion de CRP non seulement par les CE vasculaires, mais aussi par les CMLV et les macrophages. [194-196] Le palmitate, un acide gras libre saturé dont le taux circulant est très élevé chez les patients atteints d'un syndrome métabolique, contribue également à l'activation endothéliale par l'induction de la CRP chez les CE via les MAPK et le NF- κ B. [193] Fait important, Devaraj et al. ont illustré une régulation négative dose-dépendante de la CRP par les HAECs exposées *in vitro* à l'adiponectine. [197] Ces études illustrent donc la possibilité que la production de la protéine pentamérique par les CE vasculaires dans l'intima puisse être modulée et peut-être même diminuée.

L'E2 possède différents mécanismes de protection vasculaire et peut entre autres, moduler le processus inflammatoire. En effet, elle possède la capacité de diminuer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires tout en augmentant celle des molécules anti-inflammatoires. Ainsi l'E2 favorise le maintien de la disponibilité du NO, la relaxation des vaisseaux, diminue les ROS et la migration des leucocytes. [151, 155, 156] Les effets cardioprotecteurs de cette hormone féminine ont également été testés *in vivo* sur des

cohortes à grande échelle. Les premières études randomisées évaluant l'efficacité de l'hormonothérapie chez des femmes post-ménopausées telles que la « *Postmenopausal Estrogen/Progestin Intervention* » (PEPI) et la « *Nurses' Health Study* » semblaient mener cette hormone féminine vers un avenir prometteur dans la prévention et la régression des maladies cardiaques athérosclérotiques. [134, 198] Par contre, d'autres études ayant suivi n'ont pas confirmé ces effets bénéfiques et suggéraient même une augmentation du risque d'incidents thrombotiques. [199] Plusieurs facteurs peuvent expliquer les résultats contradictoires obtenus telle la composition des drogues utilisées (estrogène seul ou couplé à la progestérone), leur concentration, la période de temps ainsi que la voie d'administration. Ainsi, des études cliniques ont démontré qu'une TRH par voie orale chez des femmes post-ménopausées provoquait une hausse importante de CRP plasmatique tandis que l'administration d'E2 par voie transdermique n'induisait pas cet effet. [200] Cette hausse mise en évidence par certaines équipes de recherche n'était cependant pas accompagnée de l'induction de l'IL-6 ou d'autres protéines de phase aiguë. [163] Cette observation souligne la possibilité que l'augmentation plasmatique de la protéine dans cette situation résulte d'un autre mécanisme impliquant un passage de l'hormone vers le foie. Ce mécanisme serait alors indépendant d'une inflammation généralisée normalement modulée et induite par la cytokine IL-6. Par contre, la voie transdermale contourne le métabolisme hépatique. Ceci peut expliquer en partie l'effet différent de l'E2 administré par voie orale ou transdermale sur la fonction endothéliale. [201] En effet une administration ciblée de l'hormone peut jouer un rôle distinct et présenter un effet bénéfique pour la prévention de l'athérosclérose. En fait, notre laboratoire a établi que la livraison locale intravasculaire de cette hormone réduit le développement de resténose et améliore la réendothélisation. [141] De plus, l'E2 administrée de façon sous-cutanée à des souris CRPtg abolie la surexpression de CRP dans l'intima suite à une ligature de l'artère coronaire et diminue l'inflammation vasculaire, malgré un taux sanguin de CRP stable. [164] Ces résultats suggèrent que l'E2 induit ses effets anti-inflammatoires localement sur les cellules vasculaires et pourrait possiblement réduire l'expression de la CRP par les CE.

Nos résultats montrent en effet qu'un pré-traitement à l'E2 équivalent à sa concentration supraphysiologique et physiologique (10^{-8} et 10^{-9} M) permet de diminuer l'auto-induction de l'expression de la protéine CRP. Le temps de pré-traitement de 1 h reflète le mécanisme d'activation par sa voie rapide non génomique. Afin de déterminer si cet effet se confirme également au niveau de l'expression de l'ARNm de la CRP, nous avons entamé l'analyse de l'expression génique de la CRP par qPCR en présence ou non d'E2. Cependant, ces travaux n'ont pu être complétés par manque de temps. Ces résultats auraient permis de démontrer si cette hormone pouvait également réduire l'auto-induction de la CRP par un effet direct et rapide sur la transcription génique de la CRP. Toutefois, notre étude montre que la voie non génomique de l'hormone féminine, par l'action de ses RE, élicite une réponse qui permet la réduction de l'auto-induction protéique de la CRP par les CE. Il est connu que l'E2 possède des activités vasoprotectrices médiées par sa voie rapide non génomique. Ceci inclut la sécrétion du NO responsable de la vasodilatation, la migration et la prolifération cellulaire. [130, 139, 140, 160] À ces effets bénéfiques de l'E2 vient donc s'ajouter son potentiel à diminuer l'expression de la CRP par les CE vasculaires telle que démontrée par nos données pour la toute première fois. La signalisation cellulaire impliquée dans cette activité de l'E2 sur la CRP n'a cependant pas été investiguée. Une étude plus approfondie sur l'implication de la GPR30 ou des RE via l'activation de PI3K et des MAPK serait une avenue intéressante à poursuivre. Afin de vérifier si la voie génomique pourrait également être impliquée dans l'action bénéfique de l'E2 sur l'auto-induction de la CRP, nous avons testé un temps de pré-traitement de 24 h. À concentration physiologique (10^{-9} M), selon des résultats préliminaires, l'E2 tend également à diminuer l'expression protéique de la CRP (figure 9). Pour confirmer cette observation, des expériences supplémentaires devraient être réalisées. Cependant, les effets non génomiques étant plus probants et significatifs indiquent que cette action bénéfique de l'E2 sur l'expression de la CRP est favorisée par les signaux cellulaires de sa voie rapide.

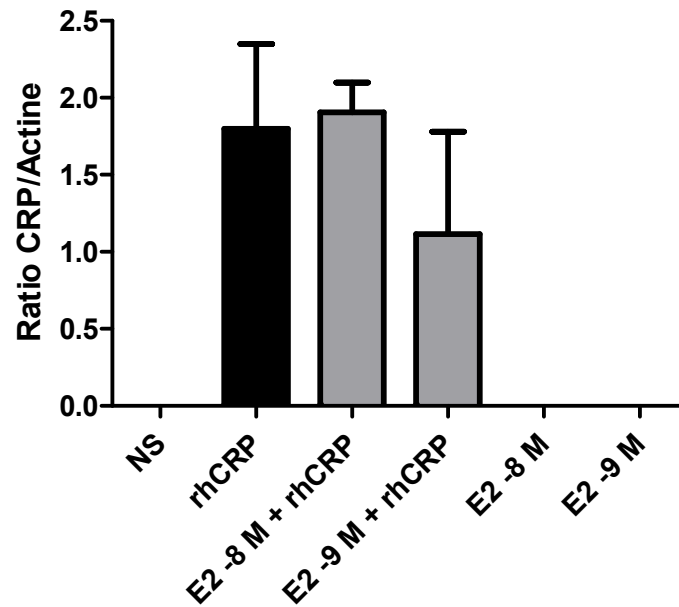


Figure 9. Évaluation de l'auto-induction de la CRP suite à un pré-traitement à l'E2 de 24 h. L'expression protéique de la CRP est évaluée chez les HAEC suite à un pré-traitement à l'E2 de 24 h (10^{-8} et 10^{-9} M) et d'une stimulation à la rhCRP de 24 h (25 ug/ml) les deux seul ou combinés. Le taux de production de CRP est déterminé par immunobuvardage de type western et normalisé sur le taux protéique de l'actine β . N=2.

3.3 Implication des récepteurs CD32 et CD64 dans l'activité biologique de la CRP

Les principaux récepteurs connus de la CRP sur les CE vasculaires sont le CD32 et le CD64, deux récepteurs FcγR. Ces derniers font de plus en plus l'objet d'études souhaitant déterminer le mécanisme d'action de la protéine pentamérique sur la réponse pro-inflammatoire des CE. Devaraj et al. ont basé plusieurs de leurs travaux sur l'étude et l'implication de ces récepteurs. Ils ont tout d'abord établi que les effets biologiques de la CRP incluant la sécrétion d'IL-8, l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 et l'inhibition de la eNOS sont médiés par les récepteurs FcγR chez les HAEC. [69] Par la suite, ils ont démontré l'implication de ces récepteurs dans l'induction du roulement, de l'adhésion et de la transmigration des monocytes aux CE. [87] Devaraj et al. proposent que la CRP se lie à ces récepteurs pour initier une signalisation transmembranaire directe qui converge vers une voie commune de la transcription, c'est-à-dire l'activation du NF-κB. Une autre étude confirme cet effet de la CRP sur la voie du NF-κB et l'induction de l'expression de VCAM-1 par le CD32. [202]. De plus, Mineo et al. soutiennent que la régulation négative de la eNOS par la protéine plasmatique implique le récepteur CD32. [79]

À partir de ces connaissances, nous avons tenté d'évaluer, tout d'abord, la modulation des récepteurs CD32 et CD64 par la CRP. Pour ce faire, les techniques d'immunobuvardage de type western et de cytométrie en flux ont été utilisées afin de déterminer leur expression totale et à la surface cellulaire des HAEC respectivement. Cependant, ces deux techniques ne nous ont pas permis de détecter leur présence chez nos cellules. Pourtant, plusieurs articles démontrent l'expression de CD32 et CD64 chez ce même type cellulaire. Toutefois, les investigateurs ont soit utilisé des concentrations très élevées de CRP (100 ug/ml) [69] avant d'évaluer l'expression de surface des récepteurs ou, ont plutôt utilisé la technique de northern blot et PCR plus sensibles mais ciblant l'ARNm et non les niveaux protéiques. [87, 202] Une meilleure stratégie utilisée plus communément dans les différentes études aurait consisté à utiliser des anticorps ou des siRNA dirigés

contre ces récepteurs afin de déterminer leur importance dans les effets biologiques de la CRP. De plus, nous aurions pu évaluer l'influence de l'E2 sur l'expression de ces récepteurs et leur signalisation pour déterminer les interconnexions possible entre ces deux voies dans la régulation de l'expression de la CRP. En effet, une étude démontre une augmentation de l'expression des récepteurs FcγR sur les macrophages spléniques par l'E2, soulignant l'existence d'une interrelation entre cette hormone et ces récepteurs. [203]

3.4 Modulation par l'E2 de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induite par la CRP

3.4.1 Hausse de production d'IL-6 et d'IL-8 induite par la CRP

Les cytokines sont des médiateurs importants du processus inflammatoire. Plusieurs études récentes ont clairement démontré que la CRP humaine, à des concentrations connues pour prédire une hausse de risques d'évènements vasculaires, induit directement un phénotype pro-inflammatoire et pro-athérogénique. La présence des cytokines inflammatoires IL-6 et IL-8 est démontrée dans la paroi artérielle humaine atteinte d'athérosclérose. Une augmentation significative de la sécrétion de ces cytokines dans la plaque fibreuse est observée dont la production locale est confirmée par la présence de transcrits géniques dans les cellules de l'intima. [204]

L'IL-6 est une cytokine multifonctionnelle qui module la réponse hépatique en phase aiguë et participe activement au processus inflammatoire de l'athérogénèse. Elle stimule la production de CRP non seulement par le foie, mais également par les CE vasculaires. [60] La protéine pentamérique, sécrétée en réponse à l'IL-6 permet également la sécrétion de plusieurs cytokines incluant la MCP-1, la M-CSF, l'IL-8 et l'IL-6. [60] De plus, la CRP peut induire la sécrétion d'IL-6 par les CMLV via l'activation du NF- κ B. La cytokine produite permet leur prolifération et participe alors à la transformation de la lésion athérosclérotique vers la plaque fibreuse. [205] Cette cytokine est donc produite par plusieurs types cellulaires présents dans la plaque d'athérome et est fortement impliquée dans le déclenchement et le maintien de l'inflammation du processus d'athérosclérose. Au niveau des CE, nous avons démontré dans notre étude une importante hausse dose-dépendante de l'auto-induction de la CRP. La production d'IL-6 par les HAEC, son principal agoniste, est alors évalué par la suite où une augmentation dose-dépendante est également obtenue. Une induction significative de cette cytokine est observée avec la plus forte dose de rhCRP utilisée, c'est-à-dire 25 ug/ml. Nos résultats corroborent avec ceux de l'équipe de recherche de Verma et al. qui ont également démontré une élévation du taux

d'IL-6 semblable suite à l'ajout d'une même dose de CRP à des CE humaines de la veine saphène. [82] Ces observations nous indiquent qu'à dose élevée, la rhCRP entraîne en plus de son auto-induction, une importante sécrétion par les HAEC de son principal agoniste, l'IL-6. Nos résultats marquent une possible implication de la sécrétion d'IL-6 dans la boucle de rétrocontrôle positive de la production de CRP liée à l'activation des CE humaines. Afin de confirmer la liaison mécanistique entre ces deux éléments, il serait intéressant de poursuivre l'étude par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'IL-6, tel que mentionné précédemment.

Une étape clé dans la formation de l'athérogénèse consiste au recrutement des cellules mononucléaires au site de lésion. Ce phénomène est en partie régulé par une importante chemokine, l'IL-8. En effet, cette cytokine inflammatoire produite par les cellules vasculaires des artères athérosclérotiques a comme principal rôle d'induire la migration des monocytes vers l'intima pour favoriser leur adhésion et leur transmigration à travers l'endothélium. L'IL-8 est aussi un important facteur angiogénique et peut induire la prolifération et la migration des CMLV. [206] Cette cytokine est donc fortement impliquée dans le processus d'athérosclérose. L'augmentation de la production d'IL-8 par les HAEC induite par la CRP via l'activation du NF- κ B est mise en évidence par une des études de Devaraj et al. [85] Cette hausse de sécrétion significative avec la dose de 25 ug/ml de rhCRP est également observée dans nos résultats. En effet, dans une expérience dose-dépendante, une augmentation marquée de la production d'IL-8 par les HAEC est obtenue suite à une stimulation à la rhCRP à concentration élevée. Ces observations soutiennent les résultats obtenus avec l'auto-induction de la CRP ainsi que la sécrétion d'IL-6, c'est-à-dire une forte augmentation de la réponse inflammatoire avec la dose de 25 ug/ml de rhCRP. Le mécanisme d'action de la CRP sur la production d'IL-8 par les CE a ensuite été investigué. Une étude de Khreiss et al. montre que la CRP induit la relâche d'IL-8 chez les neutrophiles via l'activation du NF- κ B dépendante de la formation de peroxy-nitrites (ONOO⁻). [207] Il est aussi connu que la CRP module l'activité inflammatoire entre autres, par l'activation de la NAD(P)H oxydase et la formation de ROS.[72, 208] Dans la section 1.2.2.4, nous avons décrit les principales voies signalétiques de l'activité inflammatoire de

la CRP incluant l'activation des protéines P38 MAPK et ERK1/2. Nous avons donc utilisé plusieurs inhibiteurs, soit l'apocynine (inhibiteur de la NAD(P)H oxydase), le TEMPOL (piégeur de superoxyde, 4-hydroxy-2,2,6,6-tétraméthyl pipéridinoxyl), le SB203580 (inhibiteur de la p38 MAPK) et le U0126 (inhibiteur de ERK1/2). Selon nos résultats, l'U0126 entraîne une inhibition complète de la sécrétion d'IL-8, établissant que la voie de production d'IL-8 par la CRP est dépendante de ERK1/2. Cette affirmation concorde avec une étude précédente ayant démontré une induction de l'ARNm d'IL-8 par la CRP régulée par cette même voie signalétique. [73] Également, l'absence d'effet des autres inhibiteurs utilisés comparativement à la stimulation à la rhCRP seul indique que l'IL-8 n'est pas produit sous l'action des ROS ni via la voie p38 MAPK induite par la CRP. Cette information supplémentaire met en lumière un important mécanisme utilisé par la CRP pour induire un de ses effets inflammatoires.

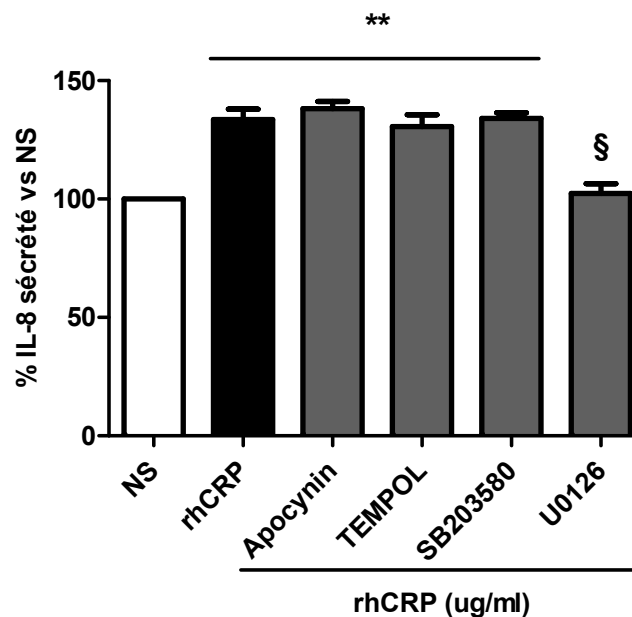


Figure 10. Évaluation de la sécrétion d'IL-8 relâchée par les HAEC suite à l'ajout d'inhibiteurs. Production d'IL-8 par les cellules suite à un traitement avec l'apocynine, le TEMPOL, le SB203580 et l'U0126 de 1 h suivi d'une stimulation à la rhCRP (25 ug/ml) de 24 h. La méthode d'ELISA est utilisée afin de mesurer le taux d'IL-8 dans les surnageants. Les résultats sont reportés en % d'IL-8 sécrétée pour chaque condition en rapport avec la condition non stimulée (NS) N=4. ** $p < 0,001$ vs Non stimulés; § $p < 0,001$ vs CRP.

3.4.2 Impact de l'E2 sur la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 induite par la CRP

Suite à l'observation d'une augmentation significative de la sécrétion des cytokines induites par la CRP, nous avons évalué la capacité de l'E2 à réduire cette activité pro-athérogénique. Tel que décrit dans la section 1.3.2.6, cette hormone réduit le processus inflammatoire en diminuant entre autres, la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8 et TNF- α par les CE. [156] En effet, une étude montre que l'E2 à 10^{-8} et 10^{-9} M inhibe l'adhésion des leucocytes en bloquant la sécrétion d'IL-8 par les HUVEC. [209] La réduction de la production d'IL-6 par l'E2 a été notée dans plusieurs types cellulaires incluant les macrophages, les CMLV et les CE.[210] De plus, nous avons révélé précédemment que l'E2 module une importante activité biologique de la CRP, c'est-à-dire son auto-induction par les CE humaines.

Ayant observé une importante réponse inflammatoire avec la plus forte concentration de rhCRP utilisée, la dose de 25 ug/ml est alors choisie pour poursuivre nos investigations. Une telle dose au niveau plasmatique représente un risque très élevé de MCV. Cependant, la concentration de CRP dans les plaques athérosclérotiques étant 10 fois plus élevée que dans une artère normale et 7.2 fois plus grande que dans le foie suggère que le taux observé dans l'athérome peut être beaucoup plus grand que dans le sérum. [63] La dose de 25 ug/ml est donc représentative d'une activité inflammatoire locale importante au site de lésion athérosclérotique. Par l'ajout d'un pré-traitement d'E2 à concentration physiologique de 1 h avant une stimulation à la rhCRP, une diminution significative de l'IL-6 et IL-8 est démontrée. Ces résultats indiquent que l'E2, par l'activation de sa voie rapide non génomique, permet d'atténuer la réponse inflammatoire de la CRP sur les CE. Fait intéressant, nous avons constaté que cet effet protecteur était similaire pour l'IL-6 et l'IL-8, soit une réduction de 21 %. Cette diminution, notée avec la dose d'E2 retrouvée normalement dans l'organisme, concorde avec nos résultats précédents sur l'auto-induction, soulignant le potentiel de cette hormone en tant qu'outil thérapeutique. Cependant, comme l'E2 peut diminuer la sécrétion de ces cytokines dans un contexte inflammatoire, nous ne pouvons pas déterminer si cette réduction est dû à un effet direct de l'hormone sur le niveau d'interleukine ou indirect via la diminution de l'auto-induction de la CRP. Toutefois, nos

résultats démontrent que l'E2 peut diminuer l'activité inflammatoire induite par la protéine pentamérique.

3.5 Impact de l'E2 sur la capacité de la CRP à induire la migration et l'adhésion des monocytes

3.5.1 Essai de migration des monocytes en Transwell

Le recrutement de leucocytes mononucléaires dans l'intima est une des premières étapes de la formation de lésions athérosclérotiques. [211] Ces derniers migrent tout d'abord vers la blessure vasculaire pour ensuite rouler et adhérer à l'endothélium pour transmigrer dans l'espace sous-endothéliale. La modulation de la chemotaxie des leucocytes par la CRP est reportée dès 1986 et confirmée par la suite par plusieurs autres études. [212-214] Elle est en partie causée par un changement d'expression de deux chimiokines clés produites par la paroi artérielle lésée, l'IL-8 et la MCP-1. En effet, comme nos résultats l'ont confirmé, la CRP augmente la sécrétion d'IL-8 par les HAEC via la voie de ERK1/2. Également, la sécrétion de la MCP-1 par les CE, aussi impliquée dans la transmigration des leucocytes, ainsi que l'expression de son récepteur CCR2 sur les monocytes, sont fortement induites en présence de la protéine pentamérique. [84, 86] Cette dernière stimule donc la migration des leucocytes vers la lésion artérielle par l'augmentation de l'expression et de l'activité des chimiokines.

Ayant démontré dans notre étude une diminution significative de la sécrétion d'IL-8 induite par la CRP suite à l'ajout d'E2 (10^{-9} M), nous souhaitons évaluer la capacité de cette dernière à réduire la migration des cellules inflammatoires induite par la CRP. Tel qu'énoncé dans la section 1.3.2.6, l'E2 atténue la sécrétion de la MCP-1 par les CE ainsi que l'expression de son récepteur par les THP-1 via la voie non génomique activée par RE- α . Il est également prouvé que l'E2 diminue la migration des cellules monocytaires humaines induite par la MCP-1 par cette même voie. [160] Ces observations attestent donc d'un rôle important de l'E2 dans la réduction du recrutement des monocytes vers la lésion athérosclérotique. Afin de déterminer si elle peut diminuer cette activité également en condition inflammatoire induite par la CRP, la migration des THP-1 en fonction de doses croissantes de rhCRP, par la méthode de Transwell, a tout d'abord été évaluée. Pour ce

faire, les HAEC sont stimulées avec différentes concentrations de la protéine et leur surnageant est récolté afin d'en évaluer le potentiel chimioattractant. Comme le démontre la figure 11, la capacité migratoire des monocytes augmente relativement avec les concentrations de rhCRP, pour atteindre une réponse maximale avec la dose de 25 ug/ml. Nos résultats confirment donc la capacité de la protéine pentamérique à induire un important recrutement monocyttaire par l'induction d'une réponse inflammatoire des CE. Suite à nos observations, nous voulions évaluer l'impact de l'effet rapide de l'E2 sur cette fonction. Toutefois, les essais n'ont pu être complétés par manque de temps. Il serait très intéressant de poursuivre ce point de l'étude afin de déterminer si l'E2 peut contrer cet effet pro-inflammatoire de la CRP et réduire ainsi la proportion de cellules inflammatoires retrouvées au niveau de l'endothélium activé.

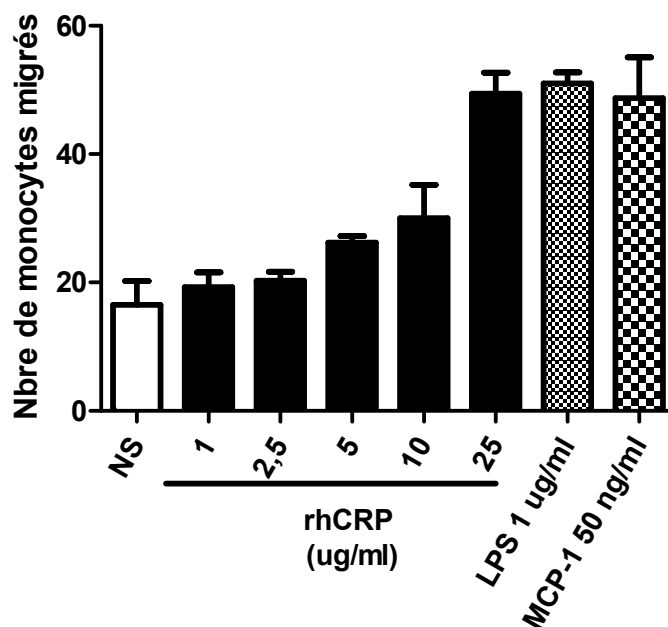


Figure 11. Migration des monocytes en fonction d'une stimulation dose-réponse de la CRP. Pour mesurer la migration des monocytes en fonction des chimioattractants relâchés par les CE, les HAEC sont tout d'abord stimulées 24 h avec des doses croissantes de rhCRP (1; 2,5; 5; 10 and 25 ug/ml) et par le LPS (1 ug/ml) utilisé comme contrôle positif de stimulation. Le surnageant est récolté et ajouté dans les puits du bas d'une plaque de 96 puits d'un système Transwell. La MCP-1 (50 ng/ml) est utilisée comme contrôle positif de migration. Les cellules THP-1 sont ajoutées dans les puits du haut de la plaque et leur capacité migratoire est évaluée suite à un temps d'incubation de 1 h 30 à 37°C en présence de 5 % de CO₂. Les cellules sont fixées au méthanol et colorées à l'hématoxyline-éosine. Trois champs uniformément espacés sur chaque membrane ont été choisis et les cellules migrées sont comptées. Le graphique est exprimé en nombre de monocytes migrés. N=2.

3.5.2 Expression d'ICAM-1/VCAM-1 et adhésion des monocytes sur une monocouche de CE

La seconde étape du recrutement des leucocytes lors de la formation de l'athérosclérose consiste à leur roulement et leur adhésion ferme aux CE de la paroi artérielle. Bien que les cellules inflammatoires n'adhèrent pas sur des endothéliums vasculaires normaux, les artères lésées de par l'expression de molécules d'adhésion,

permettent l'attachement des monocytes. Ce phénomène facilite leur transmigration vers l'intima où suite à l'ingestion de oxLDL, elles deviendront des cellules spumeuses. Les principales molécules régulant l'adhésion des monocytes à l'endothélium sont la E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1. Plusieurs équipes de recherche, dont celle de Pasceri et al, ont affirmé que l'expression de ces dernières chez les CE était augmentée par l'activité inflammatoire de la CRP. [84] Deux études confirment que cette dernière induit plus particulièrement une hausse d'expression de la molécule d'adhésion VCAM-1 par les CE via l'activation du NF- κ B, un mécanisme impliquant le récepteur CD32. [202, 215] Également, Devaraj et al illustrent que la CRP favorise l'adhésion des monocytes à une monocouche de CE en condition statique, mais également sous l'emprise de forces de cisaillement par la même voie. [87] Ce profil inflammatoire observé lors de la formation de l'athérosclérose peut toutefois être modifié par l'E2. En fait, cette dernière atténue chez les CE l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine et réduit le recrutement des monocytes aux HAEC induit par le TNF- α . [156, 157] L'impact de l'E2 sur ces mêmes activités inflammatoires provoqués par une concentration élevée de CRP est évalué par nos travaux.

Nous avons démontré par nos analyses en immunobuvardage de type western que la rhCRP à 25 ug/ml induit fortement la production protéique d'ICAM-1 et de VCAM-1 par les HAEC. L'évaluation de leur expression à la surface cellulaire par cytométrie en flux suite à une stimulation à la rhCRP a été entamée durant les travaux de maîtrise. Cependant, elle n'a pu être complétée dû à un problème avec les anticorps contrôles IgG. Toutefois, nos résultats sur le niveau des protéines totales confirment une augmentation de la production des molécules d'adhésion par la CRP, un effet partiellement inhibé par un pré-traitement d'E2. En effet, à concentration physiologique, cette dernière diminue significativement la production de VCAM-1 et atténue celle d'ICAM-1. L'étape suivante consistait à évaluer l'adhésion des monocytes à une monocouche de CE stimulées par la rhCRP combinée ou non à un pré-traitement d'E2. Pour ce faire, un kit d'adhésion, le « *CytoSelect Leukocyte-Endothelium Adhesion Assay* » de Cells Biolabs a été utilisé pour mesurer le nombre de cellules THP-1 adhérentes à une monocouche de HAEC traitées à la

rhCRP. La méthode consiste en premier lieu à introduire dans les monocytes un marqueur fluorescent. Ces cellules sont ensuite incubées avec une monocouche de HAEC stimulées. Les monocytes n'ayant pas adhérents sont par la suite lavés à l'aide d'une solution tampon. Les cellules adhérentes sont alors lysées et la fluorescence relâchée est mesurée par spectrométrie. Cependant, aucune différence n'a été notée pour chacune des conditions, que ce soit les cellules non stimulées, traitées à la rhCRP ou même au LPS et TNF- α , deux contrôles positifs utilisés communément dans la littérature pour cette expérience. [87] Une autre étudiante de notre laboratoire ayant utilisée cette même méthode sur un projet de recherche différent n'a pu également obtenir de résultats concrets. Avant d'étudier à nouveau ce paramètre, il sera nécessaire de réévaluer le protocole et d'effectuer de nouvelles mises au point.

Cette expérience aurait permis de démontrer l'effet modulateur de l'E2 sur l'adhésion des monocytes aux CE induit par la CRP. En effet, comme une hausse de production des molécules d'adhésion a été observée, nous voulions démontrer par ces essais la possibilité que l'E2 puisse empêcher une autre activité inflammatoire de la protéine pentamérique. D'autres essais seront donc essentiels afin de confirmer notre hypothèse.

3.6 L'E2 rétablit la migration des CE au VEGF altérée par la CRP

3.6.1 Inhibition de la migration des CE par la CRP

La CRP est un important médiateur inflammatoire présent aux sites vasculaires et dans les lésions athérosclérotiques qui contribue au développement et à la progression de la lésion artérielle. Pour ce faire, elle induit entre autres, son auto-induction, l'expression de molécules pro-inflammatoires et le recrutement des leucocytes à l'endothélium, tel que nous l'avons démontré à travers nos divers résultats. La réparation vasculaire est tout aussi importante que la diminution de l'inflammation pour prévenir la progression du processus d'athérogénèse. En effet, afin de permettre la guérison d'une blessure artérielle, la régénération d'un endothélium sain est primordiale. Tel que mentionné dans la section 1.1.1.2, les CE possèdent d'importantes fonctions dont le contrôle du tonus vasculaire, la régulation de l'homéostasie vasculaire, le transport régulé de fluides et de molécules ainsi que des propriétés anticoagulantes, anti-agrégantes et anti-inflammatoires.

La réendothélisation et l'angiogenèse nécessaires à la reconstitution de l'endothélium requièrent la prolifération et la migration des CE. Or, certaines évidences suggèrent que la CRP serait impliquée dans l'inhibition de ces fonctions cellulaires. En effet, une étude *in vivo* note une atténuation importante de la réendothélisation suite à une blessure artérielle de la carotide ainsi qu'un effet antiprolifératif sur les CE par un traitement à la CRP. [105] Aussi, il est connu que cette dernière altère la différenciation, la survie et la fonction angiogénique des CEP, impliquées dans la reconstitution de l'endothélium par leur capacité à se différencier en CE matures. [99] De plus, Verma et al. établissent que la CRP réduit l'activité migratoire des CE en réponse au VEGF, un phénomène centrale au processus angiogénique. [216] Un article très récent renforce cette observation en démontrant qu'une exposition chronique des CE à la protéine pentamérique inhibe leur migration. [165] Nos résultats confirment qu'un traitement de 24 h à la rhCRP (25 ug/ml) réduit la capacité migratoire des CE de plus de 50 % par rapport à la condition

basale. Cette dernière observation illustre la capacité de la protéine plasmatique non seulement à induire une importante activité inflammatoire chez les CE, mais également à moduler leur fonction angiogénique responsable en partie de la guérison vasculaire.

3.6.2 Rétablissement de la capacité migratoire des cellules traitées à la CRP par l'E2

L'angiogenèse est un phénomène critique dans la réparation vasculaire et plusieurs évidences indiquent que l'E2 favorise ce processus. L'hypothèse selon laquelle le rétablissement de l'intégrité endothéliale requiert la prolifération et la migration des CE pour inhiber la progression de l'athérogénèse est exposée par le chercheur Douglas W. Ce dernier énonce l'existence d'un mécanisme potentiel de l'E2 comme athéroprotecteur par le maintien de l'intégrité de l'endothélium. [217] Des études réalisées dans son laboratoire révèlent que l'E2 accélère en fait la récupération fonctionnelle endothéliale suite à une blessure artérielle. [217] Ceci est confirmée par des études *in vivo* menées dans notre laboratoire tel que discuté dans la section 1.3.2.4. En effet, l'amélioration de la réendothélisation et de la guérison vasculaire a été obtenue par une injection locale d'E2 après une blessure vasculaire. [141, 142] Cette hormone féminine possède la capacité d'induire la prolifération et la migration des CE et exerce ces fonctions principalement via ses RE. [218] Notre laboratoire s'est donc penché sur les mécanismes impliqués et a démontré que les effets de l'E2 chez les CE étaient médiés via l'activation du RE- α et la phosphorylation de P38 MAPK et ERK1/2. [139]

La réponse migratoire des CE au VEGF suite à un traitement à l'E2 est testée dans notre étude par un essai Transwell. Les cellules exposées à cette hormone montrent une hausse de leur activité migratoire de 49 % comparé à la condition basale. Puisque la CRP inhibe la réponse migratoire des CE au VEGF, nous avons par la suite, évalué la capacité de l'E2 à rétablir, en partie ou en totalité, cette réponse. Par un pré-traitement de 1 h, cette hormone restaure complètement cette fonction cellulaire en contrant l'effet de la protéine. Nos résultats illustrent donc pour une première fois un effet vasoprotecteur additionnel de l'E2, c'est-à-dire sa capacité à inhiber une autre activité inflammatoire majeure de la CRP

et à rétablir une importante voie pro-angiogénique. Ce postulat appuie notre hypothèse de départ quant à la possibilité que cette hormone féminine soit en mesure de réduire certains mécanismes d'action inflammatoire de la CRP sur les CE. Ces données apportent de nouvelles avancées qui permettent de mieux comprendre l'activité cardioprotectrice de l'E2 au niveau de la réendothélisation après à une blessure vasculaire ou lors de la formation d'athérosclérose. Afin de déterminer plus précisément la mécanistique utilisée par l'E2 pour contrer l'effet de la CRP sur la migration des CE, nous avons évalué l'implication de certaines molécules connues pour leur contribution à l'angiogenèse induite par cette hormone.

3.6.3 Implication du NO dans l'effet de l'E2

Le NO, produit dérivé de l'enzyme eNOS, est un médiateur clé jouant un rôle dans la vasodilatation, l'inhibition de la prolifération des CMLV et l'induction de la croissance et de la migration des CE. [219] La réduction de la biodisponibilité du NO est donc une étape critique dans le développement de l'athérosclérose. Une première étude établit que l'activité angiogénique et la croissance cellulaire régulée par le VEGF requièrent la présence de NO. Il démontre que le VEGF stimule en fait l'activation de la eNOS et la relâche du NO chez les HUVEC. [220] L'augmentation de l'expression protéique et de l'activité de la eNOS menant à l'accumulation de NO représente un autre effet vasoprotecteur de l'E2. L'implication de cette enzyme dans l'activité angiogénique de l'E2 est illustrée par l'équipe de recherche de Losordo et al. Ces derniers énoncent que cette hormone accélère la réendothélisation et atténue l'épaississement de la média suite à une blessure artérielle, des effets abolis chez des souris eNOS^{-/-}. [146]

Tel que mentionné dans la section 1.2.3, portant sur les effets pro-athérogéniques de la CRP, cette dernière réduit l'expression et l'activité de la eNOS par différents mécanismes, diminuant ainsi la production du NO nécessaire à la migration des CE. Par ailleurs, l'étude de Schneeweis et al. illustre deux voies possibles d'induction de la migration par le VEGF, soit la voie de PI3K/Akt menant à l'activation de la eNOS et la voie de ERK1/2. En effet, l'inhibition de ces voies signalétiques indépendamment l'une de

l'autre empêche la migration des CE en réponse au VEGF. Également, les auteurs démontrent que la CRP réduit la capacité migratoire des cellules par l'inhibition de la voie PI3K/Akt, ceci par la stimulation d'une phosphatase lipidique, la PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) qui déphosphoryle la position D3 de la phosphatidylinositol-(3,4,5) triphosphate et empêche l'activation de Akt. [165] Ces informations nous ont donc poussées à évaluer la capacité de l'E2 à rétablir la migration des CE traitées à la CRP par l'augmentation de la disponibilité de NO. Tout d'abord, afin de confirmer le rôle du NO dans l'effet pro-migratoire de l'E2, un traitement au L-NAME (*L-NG-Nitroarginine methyl ester*), un inhibiteur des enzymes NOS est ajouté au préalable. Une importante réduction de la migration des CE est alors obtenue comparativement au traitement à l'E2 seul, confirmant l'importance du NO dans l'effet pro-migratoire de l'E2. Cependant, la combinaison d'un traitement au L-NAME avec l'E2 et la CRP ne démontre pas une diminution semblable de la capacité migratoire des CE. Ces résultats indiquent donc que l'E2 emploie un mécanisme différent que l'apport de NO pour contrer les effets de la CRP sur la migration des CE.

Fait intéressant, un article très récent expose un rôle distinct de la eNOS dans la régénération endothéliale et la signalisation membranaire de l'E2. En effet, les auteurs révèlent que l'enzyme peut agir comme protéine signalétique indépendamment de la production de NO. [221] Cette hypothèse a été soulevée suite à l'observation que l'amélioration de la réendothélisation par l'E2 est inhibée chez des souris déficientes en eNOS (eNOS^{-/-}), mais pas par un pré-traitement L-NAME dans un modèle de blessure périvasculaire. Ces résultats suggèrent que la protéine eNOS jouerait un rôle de signalisation dans le remodelage vasculaire modulé par l'E2. Il serait donc possible que cette dernière puisse utiliser la eNOS plutôt comme molécule de signalisation en présence de CRP. Cette explication ne reste cependant qu'une hypothèse qui devrait être élaborée et testée.

3.6.4 Implication des espèces réactives à l'oxygène (ROS)

Pour faire suite à ces résultats, nous avons évalué la possible implication des ROS. Il est connu qu'une stimulation par la CRP des CE et des CMLV induit l'augmentation de la production de ROS. [72] En effet, la CRP provoque un découplage de l'enzyme eNOS, entraînant non seulement une diminution importante de NO, mais aussi une augmentation de la production de superoxydes par la NAD(P)H oxydase. [80] L'inhibition de la vasodilatation endothéliale dépendante du NO *in vivo* en réponse à la CRP est démontrée chez le porc où une forte production de superoxydes par la NAD(P)H oxydase est détectée. [72] La présence de ROS en forte quantité tend à interagir avec le NO disponible pour le transformer et produire du peroxy-nitrite, un ROS nuisible pour l'activité cellulaire. Cette réaction très rapide est favorisée relativement à la dégradation plus lente des ROS par les antioxydants. Les peroxy-nitrites, ces ions stables dont le temps de demi-vie est très élevé, sont très toxiques et causent un stress oxydant important. Ils peuvent initier la peroxydation des lipides, c'est-à-dire l'oxydation des LDL. [222] Ils causent aussi la nitration de protéines telle que la prostaglandine synthase-1, ce qui entraîne la diminution de prostacycline générée par les cellules et contribue ainsi à l'altération de la vasodilatation des vaisseaux. [83] Un taux élevé de ROS entraîne un remodelage pathologique, de la fibrose, l'activation des MMP et l'apoptose cellulaire. [223]

Le NO est produit constitutivement par la eNOS pour maintenir l'homéostasie vasculaire, mais peut aussi être synthétisé par la iNOS, une enzyme inductible sous des conditions pro-inflammatoires. Il n'est donc pas surprenant d'apprendre que la CRP induit l'expression de iNOS chez les HAEC. Cette enzyme provoque alors une importante accumulation de NO qui est immédiatement combiné aux superoxydes relâchés en forte proportion par la CRP. L'équilibre entre le NO et le ROS est donc rompu par la CRP entraînant un important stress oxydatif qui altère la survie, la prolifération et la migration des CE. L'augmentation de la concentration de ROS par rapport au NO pourrait donc en partie expliquer nos résultats obtenus avec le L-NAME en essai de migration. En effet, en considérant ce déséquilibre, l'apport seul de NO par l'E2 ne serait pas suffisant pour rétablir la capacité migratoire des cellules. Même en bloquant l'activité de la eNOS, l'E2

parvient à contrer les effets de la CRP, démontrant l'implication d'un processus plus complexe. Il est important de noter également que le L-NAME n'est pas un inhibiteur spécifique de la eNOS, mais plutôt de toutes les isoformes de NOS incluant la iNOS. Il serait donc possible qu'en réduisant l'activité de la iNOS, la concentration en peroxy-nitrites soit également diminuée, favorisant l'activité angiogénique de l'E2 sur les CE.

Tel que décrit dans la section 1.3.2.5, l'E2 régule la disponibilité du NO en diminuant entre autres, la production de superoxydes par l'inhibition de la NAD(P)H oxydase. Elle peut donc limiter la génération de peroxy-nitrites à partir du NO et des ROS. Une nouvelle hypothèse est donc soulevée proposant que l'E2 pourrait favoriser la migration de CE traitées à la CRP par le rétablissement et la normalisation de la balance entre le NO et le ROS. En effet, l'inhibition complète de la production de ROS n'est pas une solution, puisque de récentes études ont confirmé le rôle de ces molécules comme signaux intracellulaires. À faible concentration seulement, les ROS peuvent induire des mécanismes de réparation vasculaire et l'angiogenèse. Une étude confirme ce fait en démontrant l'implication du ROS dans la signalisation du VEGF relié aux réponses angiogéniques comme la migration et la prolifération des CE. [224] Des concentrations plus importantes de ROS peuvent par contre dérégler ce processus puisqu'ils favorisent entre autres la formation de peroxy-nitrite comme mentionné précédemment. Un équilibre entre le ratio NO/ROS est donc très important pour favoriser les fonctions cellulaires. Pour vérifier cette supposition, nous avons entamé tout d'abord, l'évaluation de la production de superoxydes par les CE en utilisant la technique du DCFH-DA. Les cellules, étant perméable à cette molécule, trappent cette dernière suite à l'activité des estérases intracellulaires. Les CE deviennent alors fluorescentes une fois que la molécule est oxydée par les ROS, permettant de mesurer le stress oxydant par cytométrie en flux. Par manque de temps, nous n'avons cependant pu compléter cette étude puisque des mises au point de la méthode s'imposaient. Un autre essai qui pourrait être réalisé afin d'apporter des réponses plus précises à nos questionnements est la mesure du peroxy-nitrite par les CE en présence d'E2 et de CRP, seul ou en combinaison. Ce dernier peut être déterminé par l'analyse de la présence de nitrotyrosine, une empreinte moléculaire de ONOO^- par la méthode d'ELISA.

Ces résultats permettraient de tester notre hypothèse à savoir si l'E2 aurait la capacité de réduire cette production pour favoriser ainsi l'activité migratoire.

3.6.5 Modulation de la sécrétion de VEGF et de l'expression du VEGFR-2

Un autre mécanisme possible impliqué dans l'effet bénéfique de l'E2 face au rétablissement migratoire des CE traitées à la CRP est étudié. En effet, la CRP contribue également au ralentissement de la réendothélisation par la réduction de l'activité angiogénique du VEGF. D'ailleurs, Yang et al. révèlent que la CRP diminue l'expression de l'ARNm du VEGFR-2 par les CE, le principal récepteur contrôlant l'action mitogénique de ce facteur de croissance. Ainsi la CRP atténue la prolifération des cellules et la formation de tubules induite par le VEGF en réduisant l'expression du VEGFR-2. [225] Ce phénomène représente donc un autre mécanisme utilisé par la CRP pour inhiber la capacité des CE.

D'autre part, il est reporté que l'E2 peut induire l'expression génique de VEGFR-2 ainsi que la sécrétion du VEGF.[226] L'action de ce dernier peut également être modulée par un autre récepteur à tyrosine kinase produit sous forme soluble, le sVEGFR-1. Ce récepteur agit comme antagoniste spécifique de la fonction du VEGF. En se liant par haute affinité, le sVEGFR-1 compétitionne avec le VEGFR-2 à la surface cellulaire et empêche l'interaction avec son ligand et l'activité mitogénique du VEGF. [227, 228] De récentes études affirment que l'E2 diminue la production de sVEGFR-1 tout en augmentant la sécrétion du facteur de croissance, permettant ainsi son activité angiogénique. [229, 230] Également une étude suggère que l'E2 augmente l'expression du récepteur VEGFR-2 *in vivo* chez les CE en modulant la sécrétion de VEGF par un mécanisme paracrine. [168]

Nous avons donc proposé un modèle d'angiogenèse inflammatoire où une hausse de l'expression du VEGFR-2 en réponse à l'augmentation de la sécrétion de son ligand VEGF par l'E2, pourrait contrer l'effet de la CRP et ainsi favoriser un rétablissement de la migration des CE. Pour tester cette hypothèse, nous avons donc mesuré la sécrétion du VEGF par les CE ainsi que l'expression du récepteur VEGFR-2 à la surface cellulaire suite à un traitement à l'E2 et à la rhCRP, seul ou en combinaison. Cependant, comme le

démontrent nos résultats obtenus, aucun de ses traitements n'apporte de changement à la production de VEGF et de son récepteur. En effet, nous n'avons pas observé de diminution de l'expression de VEGFR-2 avec un traitement à la rhCRP de 24 h à sa dose inflammatoire, contrairement aux résultats de Yang et al. Ce groupe de recherche avait par contre, démontré uniquement une diminution de l'ARNm du VEGFR-2 par la CRP. Également, n'ayant testé qu'un temps de pré-traitement de 1 h à l'E2, il est possible que les effets de cette hormone ne soient visibles que suite à son exposition prolongée. En effet, certaines études échelonnent les traitements à l'E2 sur plusieurs jours afin d'observer un changement. Une étude démontre qu'un minimum de 3 jours est nécessaire pour obtenir une augmentation de la sécrétion de VEGF par des cellules stromales avec une réponse maximale à 12 jours. [229] Une hausse maximale de l'ARNm du VEGF étant démontrée après 24 h de traitement seulement [226], une implication de la voie génomique de l'E2 plutôt que sa voie rapide est plus probable dans cet effet. Un pré-traitement à l'E2 de 1 h seulement n'est donc pas suffisant pour engendrer un changement au niveau de l'activité du VEGF, et de son implication dans les effets migratoires des CE traitées à la CRP.

4. Conclusion

En conclusion, nos travaux démontrent tout d'abord pour la première fois un rétrocontrôle positif autocrine ou paracrine de la production de la CRP par les CE. En effet, nos résultats illustrent un processus d'auto-induction de la protéine par les CE vasculaires pouvant être à l'origine de son augmentation locale exponentielle lors de la formation d'athérosclérose. Également, notre étude confirme que l'E2 possède la capacité de moduler l'activité pro-inflammatoire des CE vasculaires induite par la CRP. En effet, cette dernière réduit l'auto-induction de la protéine pentamérique par les CE et diminue aussi la sécrétion de son principal agoniste, l'IL-6. Une atténuation du profil inflammatoire de la CRP par l'E2 est également documentée par nos travaux et se traduit par une réduction de la production de l'IL-8, ICAM-1 et VCAM-1. Nous avons aussi établi une voie de production de l'IL-8 dépendante de ERK1/2 mettant en lumière un important mécanisme utilisé par cette dernière pour induire son activité pro-inflammatoire. Nos analyses suggèrent également, par l'utilisation d'un prétraitement de 1 h, que cette hormone féminine interfère avec les effets de la protéine pentamérique via des signaux d'activation de sa voie rapide non génomique. De plus, en explorant le potentiel angiogénique de l'E2, notre étude a démontré pour la toute première fois que cette dernière rétablit la capacité migratoire des CE altérée par la CRP. Cette nouvelle découverte nous a permis d'éclaircir un important mécanisme supplémentaire de vasculoprotection de cette hormone dans un contexte inflammatoire. Ces résultats fournissent donc une nouvelle approche à travers laquelle l'E2 pourrait améliorer la réparation vasculaire par la régulation négative d'une voie pro-athérogénique inflammatoire majeure.

Pour faire suite à nos travaux, il serait très intéressant de poursuivre l'étude de l'impact de l'E2 sur l'adhésion et la migration des monocytes induite par la CRP. Ayant démontré que cette hormone réduit l'expression de molécules pro-inflammatoires impliquées spécifiquement dans ces fonctions, son effet sur cette importante étape du développement de l'athérosclérose permettrait de mieux comprendre son rôle inhibiteur de l'activité de la protéine pentamérique. De plus, l'étude de la voie de l'auto-induction de la CRP apporterait une avancée majeure dans la caractérisation de la production locale de cette protéine inflammatoire au site de lésion. Également, la poursuite de l'évaluation du

mécanisme d'action de l'E2 sur le rétablissement de la capacité migratoire des CE traitées à la CRP serait une importante avenue d'investigation pour en parfaire notre compréhension et permettre d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles pour la réparation vasculaire en condition inflammatoire.

5. Bibliographie

1. King, M.A., et al., *Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex*. Clinical and experimental immunology, 2009. **157**(1): p. 104-18.
2. Marieb, E.N., *Anatomie et physiologie humaines*. Troisième édition ed. 2005: Éditions du renouveau pédagogique inc
3. Yousef, M., et al., *The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction*. Journal of the American College of Cardiology, 2009. **53**(24): p. 2262-9.
4. Sullivan, G.W., I.J. Sarembock, and J. Linden, *The role of inflammation in vascular diseases*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(5): p. 591-602.
5. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms*. Circ Res, 2007. **100**(2): p. 158-73.
6. Poer, J.S. and W.C. Sessa, *Evolving functions of endothelial cells in inflammation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 803-15.
7. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance*. Circulation, 2007. **115**(10): p. 1285-95.
8. Dimmeler, S. and A.M. Zeiher, *Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis?* J Mol Med, 2004. **82**(10): p. 671-7.
9. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
10. Devaraj, S., U. Singh, and I. Jialal, *The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis*. Clin Chem, 2009. **55**(2): p. 229-38.
11. Glass, C.K. and J.L. Witztum, *Atherosclerosis. the road ahead*. Cell, 2001. **104**(4): p. 503-16.
12. Mullenix, P.S., C.A. Andersen, and B.W. Starnes, *Atherosclerosis as inflammation*. Ann Vasc Surg, 2005. **19**(1): p. 130-8.
13. Wagner, D.D. and P.C. Burger, *Platelets in inflammation and thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(12): p. 2131-7.
14. Sanz, J. and Z.A. Fayad, *Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease*, in *Nature*. 2008. p. 953-957.
15. Karavidas, A., et al., *Aging and the cardiovascular system*. Hellenic J Cardiol, 2010. **51**(5): p. 421-7.
16. Howard, G., et al., *Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. JAMA, 1998. **279**(2): p. 119-24.
17. Jousilahti, P., et al., *Body weight, cardiovascular risk factors, and coronary mortality. 15-year follow-up of middle-aged men and women in eastern Finland*. Circulation, 1996. **93**(7): p. 1372-9.
18. Sunardi, et al., *Temporal trends of organochlorine pesticides in prawn (Macrobrachium nipponense) from Lake Kasumigaura, Japan, during 1978-2000*. Archives of environmental contamination and toxicology, 2004. **47**(1): p. 94-100.
19. Bernhard, D., et al., *Disruption of vascular endothelial homeostasis by tobacco smoke: impact on atherosclerosis*. FASEB J, 2003. **17**(15): p. 2302-4.
20. Shen, Y., et al., *Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes*. Am J Physiol, 1996. **270**(5 Pt 2): p. H1624-33.
21. Cachofeiro, V., et al., *Inflammation: A Link Between Hypertension and Atherosclerosis*. Current Hypertension Reviews, 2009. **5**(1): p. 40-48.

22. Schmidt, A.M. and D. Stern, *Atherosclerosis and diabetes: the RAGE connection*. Curr Atheroscler Rep, 2000. **2**(5): p. 430-6.
23. Beckman, J.A., M.A. Creager, and P. Libby, *Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management*. JAMA, 2002. **287**(19): p. 2570-81.
24. Laufs, U., et al., *Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(4): p. 809-14.
25. Considine, R.V., et al., *Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans*. N Engl J Med, 1996. **334**(5): p. 292-5.
26. Singh, P., et al., *Leptin induces C-reactive protein expression in vascular endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(9): p. e302-7.
27. Tardif, K., et al., *A phosphorylcholine-modified chitosan polymer as an endothelial progenitor cell supporting matrix*. Biomaterials, 2011. **32**(22): p. 5046-55.
28. Lavie, C.J., R.V. Milani, and H.O. Ventura, *Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(21): p. 1925-32.
29. Galle, J., R. Busse, and E. Bassenge, *Hypercholesterolemia and atherosclerosis change vascular reactivity in rabbits by different mechanisms*. Arterioscler Thromb, 1991. **11**(6): p. 1712-8.
30. Alexander, R.W., *Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective*. Hypertension, 1995. **25**(2): p. 155-61.
31. Koenig, W., *Cardiovascular biomarkers: added value with an integrated approach?* Circulation, 2007. **116**(1): p. 3-5.
32. Jialal, I., S. Devaraj, and S.K. Venugopal, *C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis?* Hypertension, 2004. **44**(1): p. 6-11.
33. Mandinova, A., et al., *The FoxO3a gene is a key negative target of canonical Notch signalling in the keratinocyte UVB response*. The EMBO journal, 2008. **27**(8): p. 1243-54.
34. Koenig, W. and N. Khuseynova, *Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(1): p. 15-26.
35. Koenig, W., *Predicting risk and treatment benefit in atherosclerosis: the role of C-reactive protein*. Int J Cardiol, 2005. **98**(2): p. 199-206.
36. Nakanishi, J., et al., *Recent advances in cell micropatterning techniques for bioanalytical and biomedical sciences*. Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry, 2008. **24**(1): p. 67-72.
37. Harris, T.B., et al., *Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly*. Am J Med, 1999. **106**(5): p. 506-12.
38. Ridker, P.M., et al., *Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men*. N Engl J Med, 1997. **336**(14): p. 973-9.
39. Ridker, P.M., et al., *Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events*. N Engl J Med, 2002. **347**(20): p. 1557-65.
40. Kuller, L.H., et al., *Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. Multiple Risk Factor Intervention Trial*. Am J Epidemiol, 1996. **144**(6): p. 537-47.
41. Koenig, W., et al., *C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992*. Circulation, 1999. **99**(2): p. 237-42.

42. Ridker, P.M., et al., *Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease*. *Circulation*, 1998. **97**(5): p. 425-8.
43. Ridker, P.M., *Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention*. *Circulation*, 2003. **107**(3): p. 363-9.
44. Volanakis, J.E., *Human C-reactive protein: expression, structure, and function*. *Mol Immunol*, 2001. **38**(2-3): p. 189-97.
45. Casas, J.P., et al., *C-reactive protein and coronary heart disease: a critical review*. *J Intern Med*, 2008. **264**(4): p. 295-314.
46. Ghose, T., *Oswald Avery: the professor, DNA, and the Nobel Prize that eluded him*. *Can Bull Med Hist*, 2004. **21**(1): p. 135-44.
47. Du Clos, T.W., *Function of C-reactive protein*. *Ann Med*, 2000. **32**(4): p. 274-8.
48. Agrawal, A., et al., *Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein*. *J Immunol*, 2001. **166**(6): p. 3998-4004.
49. Bodman-Smith, K.B., et al., *FcγRIIIa expression with FcγRI results in C-reactive protein- and IgG-mediated phagocytosis*. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(6): p. 1029-35.
50. Hammond, D.J., et al., *Identification of acidic pH-dependent ligands of pentameric C-reactive protein*. *J Biol Chem*, 2010.
51. Potempa, L.A., et al., *Antigenic, electrophoretic and binding alterations of human C-reactive protein modified selectively in the absence of calcium*. *Mol Immunol*, 1983. **20**(11): p. 1165-75.
52. Eisenhardt, S.U., et al., *C-reactive protein: how conformational changes influence inflammatory properties*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(23): p. 3885-92.
53. Ying, S.C., et al., *Identification and partial characterization of multiple native and neoantigenic epitopes of human C-reactive protein by using monoclonal antibodies*. *J Immunol*, 1989. **143**(1): p. 221-8.
54. Ji, S.R., et al., *Cell membranes and liposomes dissociate C-reactive protein (CRP) to form a new, biologically active structural intermediate: mCRP(m)*. *FASEB J*, 2007. **21**(1): p. 284-94.
55. Eisenhardt, S.U., et al., *Dissociation of pentameric to monomeric C-reactive protein on activated platelets localizes inflammation to atherosclerotic plaques*. *Circ Res*, 2009. **105**(2): p. 128-37.
56. van der Zee, P.M., et al., *C-reactive protein in myocardial infarction binds to circulating microparticles but is not associated with complement activation*. *Clin Immunol*, 2010. **135**(3): p. 490-5.
57. Chang, M.K., et al., *C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(20): p. 13043-8.
58. Singh, S.K., et al., *The connection between C-reactive protein and atherosclerosis*. *Ann Med*, 2008. **40**(2): p. 110-20.
59. Calabro, P., E. Golia, and E.T. Yeh, *CRP and the risk of atherosclerotic events*. *Semin Immunopathol*, 2009. **31**(1): p. 79-94.
60. Ferri, C., et al., *C-reactive protein: interaction with the vascular endothelium and possible role in human atherosclerosis*. *Curr Pharm Des*, 2007. **13**(16): p. 1631-45.
61. Patel, D.N., et al., *Interleukin-17 stimulates C-reactive protein expression in hepatocytes and smooth muscle cells via p38 MAPK and ERK1/2-dependent NF-κB and C/EBPβ activation*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(37): p. 27229-38.

62. Torzewski, J., et al., *C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(9): p. 1386-92.
63. Yasojima, K., et al., *Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques*. *Am J Pathol*, 2001. **158**(3): p. 1039-51.
64. Calabro, P., J.T. Willerson, and E.T. Yeh, *Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells*. *Circulation*, 2003. **108**(16): p. 1930-2.
65. Venugopal, S.K., S. Devaraj, and I. Jialal, *Macrophage conditioned medium induces the expression of C-reactive protein in human aortic endothelial cells: potential for paracrine/autocrine effects*. *Am J Pathol*, 2005. **166**(4): p. 1265-71.
66. Biro, A., et al., *Studies on the interactions between C-reactive protein and complement proteins*. *Immunology*, 2007. **121**(1): p. 40-50.
67. Sjoberg, A.P., et al., *Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting of the inhibitory activity of C4b-binding protein*. *J Immunol*, 2006. **176**(12): p. 7612-20.
68. Bharadwaj, D., et al., *The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II*. *J Exp Med*, 1999. **190**(4): p. 585-90.
69. Devaraj, S., T.W. Du Clos, and I. Jialal, *Binding and internalization of C-reactive protein by Fcgamma receptors on human aortic endothelial cells mediates biological effects*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(7): p. 1359-63.
70. Shih, H.H., et al., *CRP is a novel ligand for the oxidized LDL receptor LOX-1*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **296**(5): p. H1643-50.
71. Fujita, Y., et al., *Oxidized LDL receptor LOX-1 binds to C-reactive protein and mediates its vascular effects*. *Clin Chem*, 2009. **55**(2): p. 285-94.
72. Qamirani, E., et al., *C-reactive protein inhibits endothelium-dependent NO-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and NAD(P)H oxidase*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(5): p. 995-1001.
73. Kibayashi, E., et al., *Inhibitory effect of pitavastatin (NK-104) on the C-reactive-protein-induced interleukin-8 production in human aortic endothelial cells*. *Clin Sci (Lond)*, 2005. **108**(6): p. 515-21.
74. Liu, N., et al., *Toll-like receptor 4 signaling mediates inflammatory activation induced by C-reactive protein in vascular smooth muscle cells*. *Cell Physiol Biochem*, 2010. **25**(4-5): p. 467-76.
75. Liu, N., et al., *C-Reactive Protein Induces TNF-alpha Secretion by p38 MAPK-TLR4 Signal Pathway in Rat Vascular Smooth Muscle Cells*. *Inflammation*, 2010.
76. Nakakuki, T., et al., *Rho/Rho-kinase pathway contributes to C-reactive protein-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(10): p. 2088-93.
77. Verma, S., et al., *C-reactive protein activates the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and restenosis*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003. **126**(6): p. 1886-91.
78. Venugopal, S.K., et al., *Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells*. *Circulation*, 2002. **106**(12): p. 1439-41.
79. Mineo, C., et al., *FcgammaRIIB mediates C-reactive protein inhibition of endothelial NO synthase*. *Circ Res*, 2005. **97**(11): p. 1124-31.

80. Singh, U., et al., *C-reactive protein decreases endothelial nitric oxide synthase activity via uncoupling*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **43**(6): p. 780-91.
81. Hein, T.W., et al., *Human C-reactive protein induces endothelial dysfunction and uncoupling of eNOS in vivo*. Atherosclerosis, 2009. **206**(1): p. 61-8.
82. Verma, S., et al., *Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein*. Circulation, 2002. **105**(16): p. 1890-6.
83. Venugopal, S.K., S. Devaraj, and I. Jialal, *C-reactive protein decreases prostacyclin release from human aortic endothelial cells*. Circulation, 2003. **108**(14): p. 1676-8.
84. Pasceri, V., J.T. Willerson, and E.T. Yeh, *Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells*. Circulation, 2000. **102**(18): p. 2165-8.
85. Devaraj, S., P.R. Kumaresan, and I. Jialal, *Effect of C-reactive protein on chemokine expression in human aortic endothelial cells*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **36**(3): p. 405-10.
86. Han, K.H., et al., *C-reactive protein promotes monocyte chemoattractant protein-1--mediated chemotaxis through upregulating CC chemokine receptor 2 expression in human monocytes*. Circulation, 2004. **109**(21): p. 2566-71.
87. Devaraj, S., et al., *CRP promotes monocyte-endothelial cell adhesion via Fcgamma receptors in human aortic endothelial cells under static and shear flow conditions*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(3): p. H1170-6.
88. Zwaka, T.P., V. Hombach, and J. Torzewski, *C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis*. Circulation, 2001. **103**(9): p. 1194-7.
89. Singh, U., et al., *Human C-reactive protein promotes oxidized low density lipoprotein uptake and matrix metalloproteinase-9 release in Wistar rats*. J Lipid Res, 2008. **49**(5): p. 1015-23.
90. Li, L., et al., *C-reactive protein enhances LOX-1 expression in human aortic endothelial cells: relevance of LOX-1 to C-reactive protein-induced endothelial dysfunction*. Circ Res, 2004. **95**(9): p. 877-83.
91. Wang, C.H., et al., *C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle*. Circulation, 2003. **107**(13): p. 1783-90.
92. Cirillo, P., et al., *C-reactive protein induces tissue factor expression and promotes smooth muscle and endothelial cell proliferation*. Cardiovasc Res, 2005. **68**(1): p. 47-55.
93. Williams, T.N., et al., *C-reactive protein stimulates MMP-1 expression in U937 histiocytes through Fc[gamma]RII and extracellular signal-regulated kinase pathway:: an implication of CRP involvement in plaque destabilization*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(1): p. 61-6.
94. Montero, I., et al., *C-reactive protein induces matrix metalloproteinase-1 and -10 in human endothelial cells: implications for clinical and subclinical atherosclerosis*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(7): p. 1369-78.
95. Blaschke, F., et al., *C-reactive protein induces apoptosis in human coronary vascular smooth muscle cells*. Circulation, 2004. **110**(5): p. 579-87.
96. Singh, U., S. Devaraj, and I. Jialal, *C-reactive protein decreases tissue plasminogen activator activity in human aortic endothelial cells: evidence that C-reactive protein is a procoagulant*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(10): p. 2216-21.
97. Fadini, G.P., et al., *Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2007. **194**(1): p. 46-54.
98. George, J., et al., *Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation*. Eur Heart J, 2004. **25**(12): p. 1003-8.

99. Verma, S., et al., *C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease*. *Circulation*, 2004. **109**(17): p. 2058-67.
100. Fujii, H., et al., *C-reactive protein alters antioxidant defenses and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(11): p. 2476-82.
101. Verma, S., P.E. Szmitko, and P.M. Ridker, *C-reactive protein comes of age*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2005. **2**(1): p. 29-36; quiz 58.
102. Danenberg, H.D., et al., *Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice*. *Circulation*, 2003. **108**(5): p. 512-5.
103. Paul, A., et al., *C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Circulation*, 2004. **109**(5): p. 647-55.
104. Schwedler, S.B., et al., *Native C-reactive protein induces endothelial dysfunction in ApoE-/- mice: implications for iNOS and reactive oxygen species*. *Atherosclerosis*, 2007. **195**(2): p. e76-84.
105. Schwartz, R., et al., *C-reactive protein downregulates endothelial NO synthase and attenuates reendothelialization in vivo in mice*. *Circ Res*, 2007. **100**(10): p. 1452-9.
106. Hirschfield, G.M., et al., *Transgenic human C-reactive protein is not proatherogenic in apolipoprotein E-deficient mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(23): p. 8309-14.
107. Reifenberg, K., et al., *Role of C-reactive protein in atherogenesis: can the apolipoprotein E knockout mouse provide the answer?* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(8): p. 1641-6.
108. Matsuda, S., et al., *Human C-reactive protein enhances thrombus formation after neointimal balloon injury in transgenic rabbits*. *J Thromb Haemost*, 2010.
109. Wensley, F., et al., *Association between C reactive protein and coronary heart disease: mendelian randomisation analysis based on individual participant data*. *BMJ*, 2011. **342**: p. d548.
110. Ridker, P.M., *C-reactive protein and cardiovascular disease*. MediEdition ed. 2006.
111. Czubryt, M.P., et al., *The role of sex in cardiac function and disease*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2006. **84**(1): p. 93-109.
112. Ling, S., P. Komesaroff, and K. Sudhir, *Cellular mechanisms underlying the cardiovascular actions of oestrogens*. *Clin Sci (Lond)*, 2006. **111**(2): p. 107-18.
113. Gruber, C.J., et al., *Production and actions of estrogens*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(5): p. 340-52.
114. Paganini-Hill, A., R. Dworsky, and R.M. Krauss, *Hormone replacement therapy, hormone levels, and lipoprotein cholesterol concentrations in elderly women*. *Am J Obstet Gynecol*, 1996. **174**(3): p. 897-902.
115. Schmidt, J.B., et al., *Treatment of skin aging with topical estrogens*. *Int J Dermatol*, 1996. **35**(9): p. 669-74.
116. Calle, E.E., et al., *Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women*. *J Natl Cancer Inst*, 1995. **87**(7): p. 517-23.
117. Henderson, V.W., *The epidemiology of estrogen replacement therapy and Alzheimer's disease*. *Neurology*, 1997. **48**(5 Suppl 7): p. S27-35.
118. Nilsson, S., et al., *Mechanisms of estrogen action*. *Physiol Rev*, 2001. **81**(4): p. 1535-65.
119. Klinge, C.M., *Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors*. *Steroids*, 2000. **65**(5): p. 227-51.
120. Mendelsohn, M.E., *Protective effects of estrogen on the cardiovascular system*. *Am J Cardiol*, 2002. **89**(12A): p. 12E-17E; discussion 17E-18E.

121. Enmark, E., et al., *Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4258-65.
122. Mendelsohn, M.E. and R.H. Karas, *The protective effects of estrogen on the cardiovascular system*. N Engl J Med, 1999. **340**(23): p. 1801-11.
123. Babiker, F.A., et al., *Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(3): p. 709-19.
124. Schlegel, A., et al., *Caveolin-1 potentiates estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling. caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ERalpha*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33551-6.
125. Weigel, N.L., *Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation*. Biochem J, 1996. **319** (Pt 3): p. 657-67.
126. Karas, R.H., et al., *Growth factor activation of the estrogen receptor in vascular cells occurs via a mitogen-activated protein kinase-independent pathway*. J Clin Invest, 1998. **101**(12): p. 2851-61.
127. Mendelsohn, M.E., *Nongenomic, ER-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase: how does it work? What does it mean?* Circ Res, 2000. **87**(11): p. 956-60.
128. Hall, J.M., J.F. Couse, and K.S. Korach, *The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 36869-72.
129. Revankar, C.M., et al., *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling*. Science, 2005. **307**(5715): p. 1625-30.
130. Leung, S.W., et al., *Non-genomic vascular actions of female sex hormones: physiological implications and signalling pathways*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007. **34**(8): p. 822-6.
131. Wehling, M., *Specific, nongenomic actions of steroid hormones*. Annu Rev Physiol, 1997. **59**: p. 365-93.
132. Mendelsohn, M.E. and R.H. Karas, *Rapid progress for non-nuclear estrogen receptor signaling*. J Clin Invest, 2010. **120**(7): p. 2277-9.
133. Xing, D., et al., *Estrogen and mechanisms of vascular protection*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(3): p. 289-95.
134. *Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial*. JAMA, 1995. **273**(3): p. 199-208.
135. Sack, M.N., D.J. Rader, and R.O. Cannon, 3rd, *Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women*. Lancet, 1994. **343**(8892): p. 269-70.
136. Arnal, J.F., et al., *Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4108-13.
137. Suzuki, A., et al., *Effects of 17 beta-estradiol and progesterone on growth-factor-induced proliferation and migration in human female aortic smooth muscle cells in vitro*. Cardiovasc Res, 1996. **32**(3): p. 516-23.
138. Baker, L., et al., *The role of estrogen in cardiovascular disease*. J Surg Res, 2003. **115**(2): p. 325-44.
139. Geraldles, P., et al., *Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(10): p. 1585-90.
140. Geraldles, P., M.G. Sirois, and J.F. Tanguay, *Specific contribution of estrogen receptors on mitogen-activated protein kinase pathways and vascular cell activation*. Circ Res, 2003. **93**(5): p. 399-405.

141. Chandrasekar, B., et al., *Local delivery of 17beta-estradiol improves reendothelialization and decreases inflammation after coronary stenting in a porcine model*. Thromb Haemost, 2005. **94**(5): p. 1042-7.
142. Chandrasekar, B., S. Nattel, and J.F. Tanguay, *Coronary artery endothelial protection after local delivery of 17beta-estradiol during balloon angioplasty in a porcine model: a potential new pharmacologic approach to improve endothelial function*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(5): p. 1570-6.
143. Werner, N., et al., *Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(10): p. 1567-72.
144. Leone, A.M., et al., *Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function*. Eur Heart J, 2005. **26**(12): p. 1196-204.
145. Strehlow, K., et al., *Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation*. Circulation, 2003. **107**(24): p. 3059-65.
146. Iwakura, A., et al., *Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury*. Circulation, 2003. **108**(25): p. 3115-21.
147. Iwakura, A., et al., *Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9*. Circulation, 2006. **113**(12): p. 1605-14.
148. Hamada, H., et al., *Estrogen receptors alpha and beta mediate contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction*. Circulation, 2006. **114**(21): p. 2261-70.
149. Lemieux, C., I. Cloutier, and J.F. Tanguay, *Menstrual cycle influences endothelial progenitor cell regulation: a link to gender differences in vascular protection?* Int J Cardiol, 2009. **136**(2): p. 200-10.
150. Sader, M.A. and D.S. Celermajer, *Endothelial function, vascular reactivity and gender differences in the cardiovascular system*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(3): p. 597-604.
151. Chen, Z., et al., *Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen*. J Clin Invest, 1999. **103**(3): p. 401-6.
152. Pendaries, C., et al., *The AF-1 activation-function of ERalpha may be dispensable to mediate the effect of estradiol on endothelial NO production in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 2205-10.
153. Tolbert, T., et al., *Estrogen-induced vasoprotection is independent of inducible nitric oxide synthase expression: evidence from the mouse carotid artery ligation model*. Circulation, 2001. **104**(22): p. 2740-5.
154. Traupe, T., et al., *Distinct roles of estrogen receptors alpha and beta mediating acute vasodilation of epicardial coronary arteries*. Hypertension, 2007. **49**(6): p. 1364-70.
155. Wagner, A.H., M.R. Schroeter, and M. Hecker, *17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells*. FASEB J, 2001. **15**(12): p. 2121-30.
156. Straub, R.H., *The complex role of estrogens in inflammation*. Endocr Rev, 2007. **28**(5): p. 521-74.
157. Mikkola, T.S. and R.W. St Clair, *Estradiol reduces basal and cytokine induced monocyte adhesion to endothelial cells*. Maturitas, 2002. **41**(4): p. 313-9.

158. Seli, E., et al., *Estradiol down-regulates MCP-1 expression in human coronary artery endothelial cells*. *Fertil Steril*, 2002. **77**(3): p. 542-7.
159. Janis, K., et al., *Estrogen decreases expression of chemokine receptors, and suppresses chemokine bioactivity in murine monocytes*. *Am J Reprod Immunol*, 2004. **51**(1): p. 22-31.
160. Yada-Hashimoto, N., et al., *Estrogen and raloxifene inhibit the monocytic chemoattractant protein-1-induced migration of human monocytic cells via nongenomic estrogen receptor alpha*. *Menopause*, 2006. **13**(6): p. 935-41.
161. Geraldes, P., et al., *Estradiol blocks the induction of CD40 and CD40L expression on endothelial cells and prevents neutrophil adhesion: an ERalpha-mediated pathway*. *Cardiovasc Res*, 2006. **71**(3): p. 566-73.
162. Vongpatanasin, W., et al., *Differential effects of oral versus transdermal estrogen replacement therapy on C-reactive protein in postmenopausal women*. *J Am Coll Cardiol*, 2003. **41**(8): p. 1358-63.
163. Duvernoy, C., *Estrogen and C-reactive protein: does an alternate route lead to a more attractive destination?* *Thromb Haemost*, 2003. **90**(1): p. 1-2.
164. Wang, D., et al., *Estrogen treatment abrogates neointima formation in human C-reactive protein transgenic mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(10): p. 2094-9.
165. Schneeweis, C., et al., *Chronic CRP-exposure inhibits VEGF-induced endothelial cell migration*. *J Atheroscler Thromb*, 2010. **17**(2): p. 203-12.
166. Miller, V.M. and S.P. Duckles, *Vascular actions of estrogens: functional implications*. *Pharmacol Rev*, 2008. **60**(2): p. 210-41.
167. Sanchez, A.M., et al., *Estrogen receptor-{alpha} promotes endothelial cell motility through focal adhesion kinase*. *Mol Hum Reprod*, 2011. **17**(4): p. 219-26.
168. Herve, M.A., et al., *Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus*. *J Endocrinol*, 2006. **188**(1): p. 91-9.
169. Lee Biosolutions. 2011; Available from: <http://www.leebio.com/c-reactive-protein-human-recombinant-P397.html>.
170. Jeney, E. and T. Zsolnai, *[Study of the bacteriostatic and fungistatic effect of sodium azide and potassium cyanide]*. *Zentralbl Bakteriolog Orig*, 1958. **171**(1-2): p. 117-23.
171. Palmer, G., *Current issues in the chemistry of cytochrome c oxidase*. *J Bioenerg Biomembr*, 1993. **25**(2): p. 145-51.
172. Taylor, K.E., J.C. Giddings, and C.W. van den Berg, *C-reactive protein-induced in vitro endothelial cell activation is an artefact caused by azide and lipopolysaccharide*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(6): p. 1225-30.
173. Liu, C., et al., *Proapoptotic, antimigratory, antiproliferative, and antiangiogenic effects of commercial C-reactive protein on various human endothelial cell types in vitro: implications of contaminating presence of sodium azide in commercial preparation*. *Circ Res*, 2005. **97**(2): p. 135-43.
174. Bisioendial, R., J. Kastelein, and E. Stroes, *In response to van den Berg et al: on the direct actions of CRP in humans*. *Circ Res*, 2005. **97**(7): p. e71.
175. Dasu, M.R., et al., *The biological effects of CRP are not attributable to endotoxin contamination: evidence from TLR4 knockdown human aortic endothelial cells*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(3): p. 509-12.
176. Hirschfeld, M., et al., *Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages*. *Infect Immun*, 2001. **69**(3): p. 1477-82.

177. Satta, N., et al., *Induction of TLR2 expression by inflammatory stimuli is required for endothelial cell responses to lipopeptides*. Mol Immunol, 2008. **46**(1): p. 145-57.
178. Diehl, E.E., et al., *Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue*. Am J Med Sci, 2000. **319**(2): p. 79-83.
179. Devaraj, S., S. Venugopal, and I. Jialal, *Native pentameric C-reactive protein displays more potent pro-atherogenic activities in human aortic endothelial cells than modified C-reactive protein*. Atherosclerosis, 2006. **184**(1): p. 48-52.
180. Khreiss, T., et al., *Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells*. Circulation, 2004. **109**(16): p. 2016-22.
181. Taylor, K.E. and C.W. van den Berg, *Structural and functional comparison of native pentameric, denatured monomeric and biotinylated C-reactive protein*. Immunology, 2007. **120**(3): p. 404-11.
182. Udvarnoki, K., et al., *Antibodies against C-reactive protein cross-react with 60-kilodalton heat shock proteins*. Clin Vaccine Immunol, 2007. **14**(4): p. 335-41.
183. Ji, S.R., et al., *Monomeric C-reactive protein activates endothelial cells via interaction with lipid raft microdomains*. FASEB J, 2009. **23**(6): p. 1806-16.
184. Wang, M.S., et al., *C-reactive protein (CRP) aptamer binds to monomeric but not pentameric form of CRP*. Anal Bioanal Chem, 2011.
185. Zouki, C., et al., *Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with promotion of neutrophil-endothelial cell adhesion*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5355-61.
186. Kushner, I. and G. Feldmann, *Control of the acute phase response. Demonstration of C-reactive protein synthesis and secretion by hepatocytes during acute inflammation in the rabbit*. J Exp Med, 1978. **148**(2): p. 466-77.
187. Steel, D.M. and A.S. Whitehead, *The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein*. Immunol Today, 1994. **15**(2): p. 81-8.
188. Yasojima, K., et al., *Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease*. Brain Res, 2000. **887**(1): p. 80-9.
189. Inoue, T., et al., *Local release of C-reactive protein from vulnerable plaque or coronary arterial wall injured by stenting*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(2): p. 239-45.
190. Dong, Q. and J.R. Wright, *Expression of C-reactive protein by alveolar macrophages*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4815-20.
191. Jabs, W.J., et al., *The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo*. Eur J Immunol, 2003. **33**(1): p. 152-61.
192. Calabro, P., et al., *Release of C-reactive protein in response to inflammatory cytokines by human adipocytes: linking obesity to vascular inflammation*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(6): p. 1112-3.
193. Mugabo, Y., Y. Mukaneza, and G. Renier, *Palmitate induces C-reactive protein expression in human aortic endothelial cells. Relevance to fatty acid-induced endothelial dysfunction*. Metabolism, 2010.
194. Han, C., et al., *Angiotensin II induces C-reactive protein expression through ERK1/2 and JNK signaling in human aortic endothelial cells*. Atherosclerosis, 2010.
195. Li, M., et al., *Angiotensin II induces the expression of c-reactive protein via MAPK-dependent signal pathway in U937 macrophages*. Cell Physiol Biochem, 2011. **27**(1): p. 63-70.

196. Peng, N., et al., *Angiotensin II-induced C-reactive protein generation: inflammatory role of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2007. **193**(2): p. 292-8.
197. Devaraj, S., et al., *Adiponectin decreases C-reactive protein synthesis and secretion from endothelial cells: evidence for an adipose tissue-vascular loop*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(7): p. 1368-74.
198. Stampfer, M.J., et al., *Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study*. *N Engl J Med*, 1991. **325**(11): p. 756-62.
199. Hsia, J., et al., *Conjugated equine estrogens and coronary heart disease: the Women's Health Initiative*. *Arch Intern Med*, 2006. **166**(3): p. 357-65.
200. Lacut, K., et al., *Differential effects of oral and transdermal postmenopausal estrogen replacement therapies on C-reactive protein*. *Thromb Haemost*, 2003. **90**(1): p. 124-31.
201. Mikkola, T.S. and T.B. Clarkson, *Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function*. *Cardiovasc Res*, 2002. **53**(3): p. 605-19.
202. Liang, Y.J., et al., *C-reactive protein activates the nuclear factor-kappaB pathway and induces vascular cell adhesion molecule-1 expression through CD32 in human umbilical vein endothelial cells and aortic endothelial cells*. *J Mol Cell Cardiol*, 2006. **40**(3): p. 412-20.
203. Gomez, F., et al., *Enhancement of splenic-macrophage Fcgamma receptor expression by treatment with estrogens*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001. **8**(4): p. 806-10.
204. Rus, H.G., R. Vlaicu, and F. Niculescu, *Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall*. *Atherosclerosis*, 1996. **127**(2): p. 263-71.
205. Hattori, Y., M. Matsumura, and K. Kasai, *Vascular smooth muscle cell activation by C-reactive protein*. *Cardiovasc Res*, 2003. **58**(1): p. 186-95.
206. Yue, T.L., et al., *Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells*. *Circ Res*, 1994. **75**(1): p. 1-7.
207. Khreiss, T., et al., *Loss of pentameric symmetry in C-reactive protein induces interleukin-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils*. *Circ Res*, 2005. **97**(7): p. 690-7.
208. Kobayashi, S., et al., *Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(8): p. 1398-404.
209. Rodriguez, E., et al., *17Beta-estradiol inhibits the adhesion of leukocytes in TNF-alpha stimulated human endothelial cells by blocking IL-8 and MCP-1 secretion, but not its transcription*. *Life Sci*, 2002. **71**(18): p. 2181-93.
210. Keck, C., et al., *Effects of 17beta-estradiol and progesterone on interleukin-6 production and proliferation of human umbilical vein endothelial cells*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1998. **106**(4): p. 334-9.
211. Ross, R., *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. *Am Heart J*, 1999. **138**(5 Pt 2): p. S419-20.
212. Whisler, R.L., et al., *Modulation of human monocyte chemotaxis and procoagulant activity by human C-reactive protein (CRP)*. *Lymphokine Res*, 1986. **5**(3): p. 223-8.
213. Zhong, W., et al., *Effect of human C-reactive protein on chemokine and chemotactic factor-induced neutrophil chemotaxis and signaling*. *J Immunol*, 1998. **161**(5): p. 2533-40.

214. Torzewski, M., et al., *C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(9): p. 2094-9.
215. Kawanami, D., et al., *C-reactive protein induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB activation in vascular endothelial cells*. *Atherosclerosis*, 2006. **185**(1): p. 39-46.
216. Verma, S., et al., *A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis*. *Circulation*, 2002. **106**(8): p. 913-9.
217. Losordo, D.W. and J.M. Isner, *Estrogen and angiogenesis: A review*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(1): p. 6-12.
218. Morales, D.E., et al., *Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model*. *Circulation*, 1995. **91**(3): p. 755-63.
219. Kawasaki, K., et al., *Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(16): p. 5726-37.
220. Papapetropoulos, A., et al., *Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(12): p. 3131-9.
221. Billon, A., et al., *The estrogen effects on endothelial repair and mitogen-activated protein kinase activation are abolished in endothelial nitric-oxide (NO) synthase knockout mice, but not by NO synthase inhibition by N-nitro-L-arginine methyl ester*. *Am J Pathol*, 2008. **172**(3): p. 830-8.
222. Darley-Usmar, V.M., et al., *The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein*. *Free Radic Res Commun*, 1992. **17**(1): p. 9-20.
223. Takimoto, E. and D.A. Kass, *Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling*. *Hypertension*, 2007. **49**(2): p. 241-8.
224. Ushio-Fukai, M. and R.W. Alexander, *Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase*. *Mol Cell Biochem*, 2004. **264**(1-2): p. 85-97.
225. Yang, H., et al., *C-reactive protein decreases expression of VEGF receptors and neuropilins and inhibits VEGF165-induced cell proliferation in human endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **333**(3): p. 1003-10.
226. Suzuma, I., et al., *17 Beta-estradiol increases VEGF receptor-2 and promotes DNA synthesis in retinal microvascular endothelial cells*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999. **40**(9): p. 2122-9.
227. Kendall, R.L., G. Wang, and K.A. Thomas, *Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **226**(2): p. 324-8.
228. Shibuya, M., *Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis*. *J Biochem Mol Biol*, 2006. **39**(5): p. 469-78.
229. Okada, H., et al., *Estrogen and selective estrogen receptor modulators regulate vascular endothelial growth factor and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in human endometrial stromal cells*. *Fertil Steril*, 2010. **93**(8): p. 2680-6.
230. Garvin, S., U.W. Nilsson, and C. Dabrosin, *Effects of oestradiol and tamoxifen on VEGF, soluble VEGFR-1, and VEGFR-2 in breast cancer and endothelial cells*. *Br J Cancer*, 2005. **93**(9): p. 1005-10.